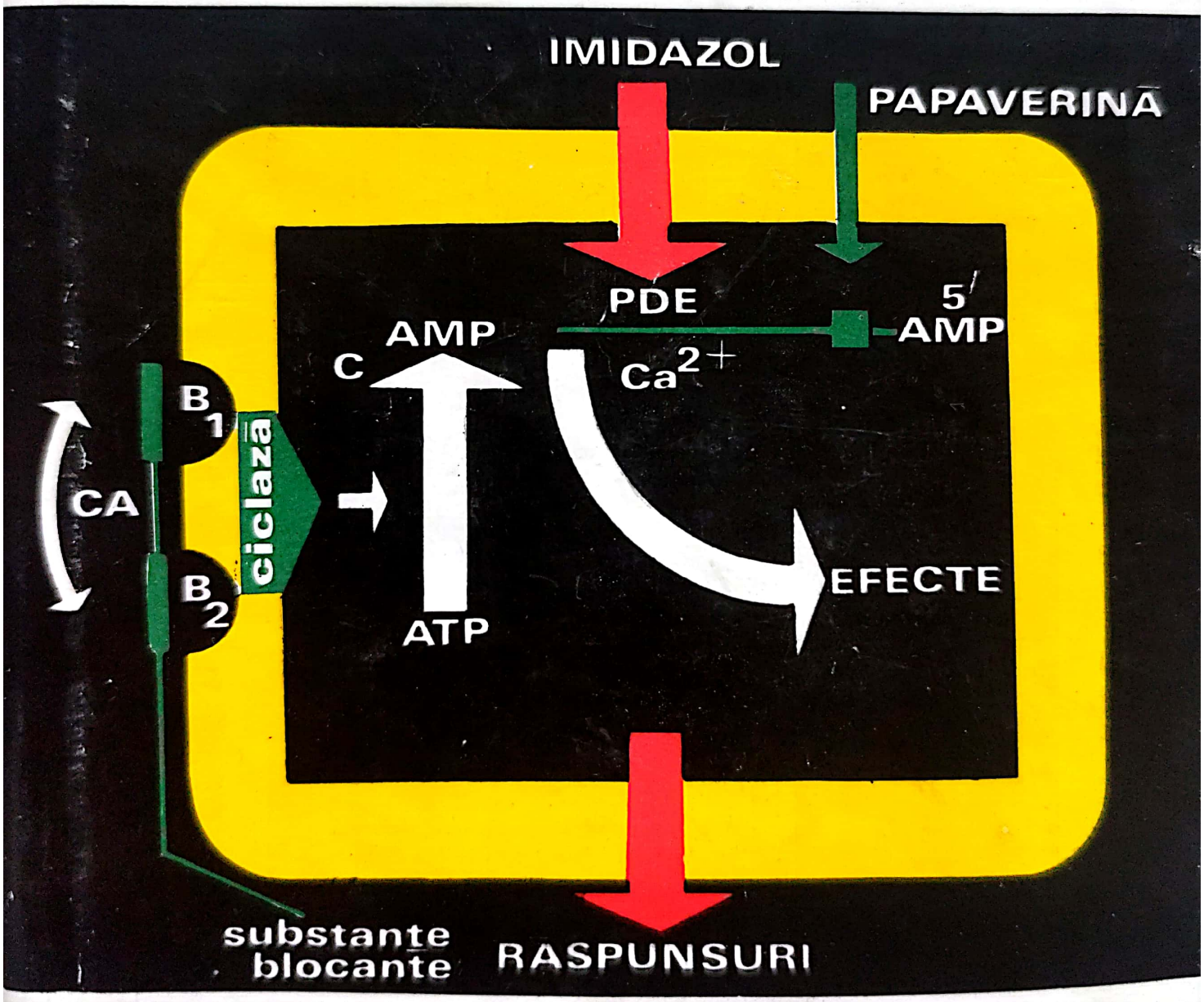
mecanisme enzimatice în FARMACODINAMIE

V. Voicu ~ R. Olinescu



editura științifică și enciclopedică

Scanned with OKEN Scanner

577.1

Dr. VICTOR VOICU

Dr. RADU OLINESCU

MECANISME ENZIMATICE în FARMACODINAMIE

Scanned with OKEN Scanner

Cuprins

CAPITOLUL 1. **Aspecte de farmacocinetică** (Dr. R. Olinescu)

1.1. Noțiuni generale de farmacocinetică 11
1.2. Factori implicați în absorbția medicamentelor 15
1.2.1. Solubilitatea medicamentelor 15
1.2.2. Teoria partiției în funcție de *p*H 16
1.2.3. Influența masei moleculare 19
1.2.4. Absorbția la nivelul tractului gastrointestinal 21
1.3. Distribuția și transportul medicamentelor 24
1.3.1. Legarea medicamentelor cu proteine 26
1.3.2. Medicamente și transportul prin membrane 31
1.4. Eliminarea medicamentelor 33
1.4.1. Viteza eliminării medicamentelor 33
1.4.2. Căi de eliminare 35
1.4.2.1. Eliminarea pe cale renală 35
1.4.2.2. Eliminarea medicamentelor pe cale digestivă 37
Bibliografie 37

CAPITOLUL 2. **Metabolizarea medicamentelor** (Dr. R. Olinescu)

2.1. Generalități 40
2.2. Hidroxilarea medicamentelor 44
2.2.1. Sistemul enzimatic microzomial 44
2.2.2. Inducția enzimatică 51
2.2.3. Reacții de oxidoreducere microzomiale 58
2.2.3.1. Dezalchilări 58
2.2.3.2. Hidroxilarea aromatică 60
2.2.3.3. Oxidări 63
2.2.3.4. Dezaminarea oxidativă 64

Scanned with OKEN Scanner

2.2.3.5. Desulfurarea 65
2.2.3.6. Reducere prin enzime microzomiale 65
2.3. Metabolizarea medicamentelor de sisteme nemicrozomiale 68
2.3.1. Oxidări nemicrozomiale 68
2.3.2. Reduceri 69
2.3.3. Dehidroxilarea aromatică 70
2.3.4. Hidroliza 70
2.3.5. Scindări de ciclu 71
2.3.6. Dehalogenări 72
2.3.7. Acetilarea 72
2.4. Mecanisme de conjugare 73
2.4.1. Sinteza de glucuronizi 73
2.4.2. Esteri sulfați 75
2.4.3. Acizi mercapturici 76
2.4.4. Conjugarea cu aminoacizi 76
2.4.5. Acilarea 78
2.4.6. Metilarea 78
2.5. Factori perturbatori 80
2.5.1. Factori genetici 82
2.5.1.1. Specia 82
2.5.1.2. Factori individuali 83
2.5.2. Factori fiziologici 84
2.5.2.1. Vîrsta 84
2.5.2.2. Sexul 84
2.5.2.3. Graviditatea 85
2.5.3. Factori de mediu 85
2.5.3.1. Starea și felul nutriției 85
2.5.3.2. Stress 86
2.5.3.3. Iradierea 86
2.5.3.4. Compuși exogeni 86
Bibliografie 87

CAPITOLUL 3. **Sistemul colinergic** (Dr. Victor Voicu)

3.1. Sinteza acetilcolinei 93
3.1.1. Colinacetil-transferaza 93
3.1.1.1. Localizare 93
3.1.1.2. Mecanism 94
3.1.1.3. Efectul inhibitorilor SH 95
3.1.2. Inhibitorii specifici ai colin-acetilazei 95
3.1.3. Transportul colinei 96
3.1.4. Inhibitorii transportului colinei 97

Scanned with OKEN Scanner

3.2. Depozitarea acetilcolinei 98
3.3. Eliberarea acetilcolinei 100
3.3.1. Cuplajul stimul-eliberare 100
3.3.2. Eliberatorii de acetilcolină 101
3.3.3. Inhibitori ai eliberării de acetilcolină 103
3.4. Receptorul colinergic 104
3.4.1. Structură, proprietăţi 104
3.4.2. Interacţiunea receptorului colinergic cu agoniştii şi antagoniştii colinergici 106
3.4.3. Desensibilizarea receptorului 108
3.5. Hidroliza enzimatică a acetilcolinei 109
3.5.1. Colin-esterazele 109
3.5.1.1. Distribuţie şi localizare 109
3.5.1.2. Structură 110
3.5.1.3. Izoenzime 112
3.5.1.4. Hidroliza acetilcolinei 113
3.5.1.5. Substanţe care potenţează activitatea AchE 114
3.5.2. Inhibiţia colin-esterazelor 116
3.5.2.1. Fosforilarea colin-esterazelor 116
3.5.2.2. Reactivarea spontană 118
3.5.2.3. Îmbătrînirea colin-esterazei fosforilate 118
3.5.2.4. Reactivarea prin atac nucleofilic 120
3.5.2.5. Carbamilarea colinesterazelor 122
Bibliografie 124

CAPITOLUL 4. **Sistemul adrenergic** (Dr. Victor Voicu)

4.1. Sinteza catecolaminelor 130
4.1.1. Inhibitori ai sintezei catecolaminelor 132
4.1.1.1. Inhibitorii tirozin-hidroxilazei 132
4.1.1.2. Inhibitorii dopa-decarboxilazei 132
4.1.1.3. Inhibitorii dopamin-β-hidroxilazei 132
4.1.1.4. Inhibitorii feniletanolamin-*N*-metil-transferazei (PNMT) 133
4.2. Captarea CA 133
4.2.1. Inhibitori ai captării CA 135
4.3. Depozitarea 138
4.4. Eliberarea CA 139
4.4.1. Eliberatori de CA 140
4.4.2. Blocanţi ai eliberării de CA 142

Scanned with OKEN Scanner

4.5. Captarea și eliberarea de falși transmițători adrenergici 143
4.6. Receptorii adrenergici 145
4.6.1. Receptorii α-adrenergici 146
4.6.2. Receptorii β-adrenergici 147
4.6.3. Interacția receptorilor adrenergici cu agoniștii și antagoniștii adrenergici 149
4.7. Degradarea enzimatică a catecolaminelor 151
4.7.1. Monoamin-oxidaza 151
4.7.1.1. Inhibitorii monoamin-oxidazei 154
4.7.2. Catecol-*O*-metil-transferaza 157
4.7.2.1. Inhibitorii COMT 158
Bibliografie 159

CAPITOLUL 5. **Interrelațiile farmacologice ale sistemului AMP ciclic** (Dr. Victor Voicu)

5.1. Sistemul AMP ciclic 165
5.1.1. AMP ciclic 165
5.1.2. Adenilat-ciclaza 169
5.1.3. Fosfo-diesteraza 171
5.2. AMP ciclic și transmisia sinaptică 173
5.2.1. Transmisia sinaptică centrală și ganglionară 173
5.2.2. AMP ciclic și substanțele farmacodinamic active neuropsihotrope 175
5.3. Contracția musculaturii striate și miocardice 176
5.3.1. AMP ciclic și musculatura striată 176
5.3.2. AMP ciclic și funcția inotropă miocardică 177
5.4. Contracția și relaxarea farmacologică a musculaturii netede 179
5.4.1. Adenilat-ciclaza și receptorul adrenergic 179
5.4.1.1. Contracția adrenergică a musculaturii netede 182
5.4.1.1.1. Contracția uterină 182
5.4.1.1.2. Contracția mușchiului neted arterial 183
5.4.1.2. Relaxarea adrenergică 184
5.4.2. Corelațiile *c*AMP *c*GMP — sistem colinergic 185
5.4.2.1. Contracția colinergică a musculaturii netede 186
5.4.3. Relaxantele „musculotrope" ale musculaturii netede 188
5.5. AMP ciclic — substanțe farmacodinamic active lipolitice și antilipolitice 190
5.5.1. AMP ciclic și lipoliza 190
5.5.1.1. Catecolaminele, AMP ciclic și lipoliza 193
5.5.1.2. Substanțe lipolitice prin creșterea AMP ciclic 194

Scanned with OKEN Scanner

5.5.1.3. Substanțe antilipolitice prin scăderea AMP ciclic .. 194
5.5.1.4. Alte substanțe antilipolitice prin scăderea AMP ciclic 197
5.6. Acțiuni farmacodinamice ale cAMP și derivaților 198
5.7. AMP ciclic și cuplajul stimul—efect farmacodinamic..... 201
Bibliografie 203

CAPITOLUL 6. **Mecanisme biochimice implicate în acțiunea compușilor neuropsihotropici** (Dr. R. Olinescu)

6.1. Metabolismul catecolaminelor 211
6.1.1. Biosinteza catecolaminelor..... 211
6.1.2. Catabolismul catecolaminelor 214
6.1.3. Depozitarea și încorporarea catecolaminelor..... 217
6.1.4. Dopamina și acțiunea DOPA 220
6.1.5. Acțiunea centrală a catecolaminelor 225
6.2. Serotonina 230
6.3. Alți mediatori chimici..... 232
6.4. Agenți halucinogeni 233
6.5. Fenotiazine.. 238
6.6. Amfetamine 242
Bibliografie 243

CAPITOLUL 7. **Mecanisme biochimice în radioprotecție și radiosensibilizare** (Dr. R. Olinescu)

7.1. Boala de iradiere 247
7.2. Radioprotectori chimici..... 254
7.3. Radiosensibilizatori..... 262
Bibliografie 267

CAPITOLUL 8. **Farmacogenetica** (Dr. R. Olinescu)

8.1. Introducere 272
8.2. Deficit congenital enzimatic 274
8.2.1 Variante genetice ale acetilării medicamentelor..... 274
8.2.2. Polimorfismul pseudocolin-esterazei 275
8.2.3. Deficit în glucozo-6-fosfat-dehidrogenază 275

Scanned with OKEN Scanner

8.2.4. Hemoglobine anormale 277
8.2.5. Methemoglobinemie ereditară 281
8.3. Boli ereditare de interes farmacogenetic 284
8.3.1. Porfirii 284
8.3.2. Metabolismul bilirubinei 287
8.4. Variații genetice care modifică răspunsul la medicamente 288
8.4.1. Rezistența la anticoagulante 288
8.4.2. Noi domenii de investigație 289
Bibliografie 290

CAPITOLUL 9. **Prostaglandinele și implicațiile lor farmacologice** (Dr. Victor Voicu)

9.1. Structură chimică, nomenclatură 294
9.2. Biosinteză 296
9.3. Eliberarea prostaglandinelor 297
9.4. Receptorul prostaglandinic 298
9.5. Inactivarea enzimatică a prostaglandinelor 299
9.6. Efectele farmacologice ale prostaglandinelor 301
9.6.1. Interrelațiile prostaglandine-sistem adrenergic 301
9.6.2. Interrelațiile prostaglandine-AMP ciclic 301
9.6.3. Răspunsul inflamator 302
9.6.4. Efecte asupra musculaturii netede 304
9.6.4.1. Mușchi neted vascular 304
9.6.4.2. Mușchi neted bronșic 304
9.6.4.3. Mușchi neted și unele funcții ale tubului digestiv 305
9.6.4.4. Miometru și organele de reproducere 306
9.6.5. Efecte la nivelul miocardului și musculaturii striate 306
9.6.6. Efecte asupra funcției renale 307
9.6.7. Efecte asupra S.N.C. 308
9.6.8. Efecte asupra agregării trombocitare 309
9.7. Inhibitorii sintezei prostaglandinelor 310
9.7.1. Analogii de substrat 310
9.7.2. Inhibitorii de tip aspirinic 311
9.7.2.1. Mecanismul inhibiției prin substanțe de tip aspirinic 312
9.7.2.2. Mecanismul unor efecte secundare ale substanțelor de tip aspirinic 314
9.8. Inhibitorii degradării enzimatice a prostaglandinelor 315
Bibliografie 315

CAPITOLUL 1

ASPECTE DE FARMACOCINETICĂ

1.1. Noțiuni generale de farmacocinetică

Pentru a-și exercita efectul farmacodinamic, un medicament trebuie mai întîi să pătrundă în organism și apoi să ajungă la organul unde are loc acțiunea respectivă. Acțiunea farmacodinamică este rezultatul interacțiunii dintre medicament și organism. Consecința acestei interacțiuni este stimularea sau inhibarea unor funcții fiziologice și aducerea la un nivel fiziologic a unor funcții perturbate.

Pentru a ajunge la locul acțiunii, un medicament, ca și în general compușii străini organismului, va fi supus acțiunii unor procese fizico-chimice, terminînd în final cu eliminarea lor din organism. Fiecare proces poate fi influențat de o serie de factori menționați în continuare, așa încît, prin administrare, un medicament este antrenat într-un lung și complex lanț de transformări biochimice, în multe cazuri insuficient cunoscute. Ca și în toată cartea, dealtfel, întregul proces al acțiunii unui medicament, de la administrare pînă la eliminare, va fi tratat biochimic, evitînd în mare măsură interpretările pur farmacologice sau terapeutice.

Acțiunea medicamentelor poate fi evidențiată la scara organismului întreg, a unui organ sau la nivel celular sau molecular. Descrierea efectelor la primele două nivele este de domeniul farmacodinamiei clasice. Extinderea cunoașterii acțiunii medicamentelor la nivel celular sau molecular ce permit studierea mecanismelor de acțiune intră în cadrul farmacodinamiei biochimice. Într-adevăr, medicamentele pot acționa la suprafața sau în interiorul celulei. În primul caz se produce o acțiune asupra membranei celulare, în care pe lîngă reacții chimice

intervin și efecte fizice. În interiorul celulei sau la nivelul membranei, medicamentul acționează asupra unor molecule, în funcție de structura lui chimică, cu o afinitate variabilă. Acest grup de molecule, de obicei complexe proteice macromoleculare, constituie receptorii, asemănători din multe puncte de vedere cu centrii activi ai enzimelor. Dealtfel, datorită unei asemănări de structură, a existenței unor grupări chimice libere și reactive, un medicament de cele mai multe ori interacționează și cu alți compuși cu care vine în contact, producînd sau nu alte efecte [1].

Căile de pătrundere în organism a medicamentelor, sau în general a substanțelor străine organismului pot fi împărțite în două mari clase: enterale și parenterale. Prin administrație enterală, medicamentul este introdus direct în tractul gastrointestinal (per os, sublingual, ori rectal). Prin administrarea parenterală se evită tractul gastrointestinal, obținîndu-se efecte terapeutice mai rapide în urma injectării (intravenoasă, subcutană, intramusculară), aplicării direct pe piele, ori prin inhalare.

Înainte de a trece la studierea mecanismelor implicate în farmacocinetică, vom aminti cîteva noțiuni e enzimologie, care au o mare aplicativitate și în alte domenii, printre care acelea de care ne ocupăm. Astfel, conform fig. 1.1 și tabelului I, un medicament, ca și un substrat, x, se va absorbi sau va reacționa în timp, după o cinetică de ordin zero sau de ordinul întîi.

Absorbția medicamentelor decurge, ori cu o viteză constantă independentă de cantitatea de medicament absorbită (ordin

TABELUL I

Ordinul	*Ecuația*	*Unități ale constantei de viteză*	*Caracteristici*
Zero	$\frac{dx}{dt} = k^{\circ}$	Moli · s^{-1}	Viteza este constantă și independentă de concentrația substratului
Intîi	$\frac{dx}{dt} = k'(a - x)$	s^{-1}	Pentru fiecare interval de timp, o fracțiune constantă x intră în reacție

a = concentrația inițială a substanței x

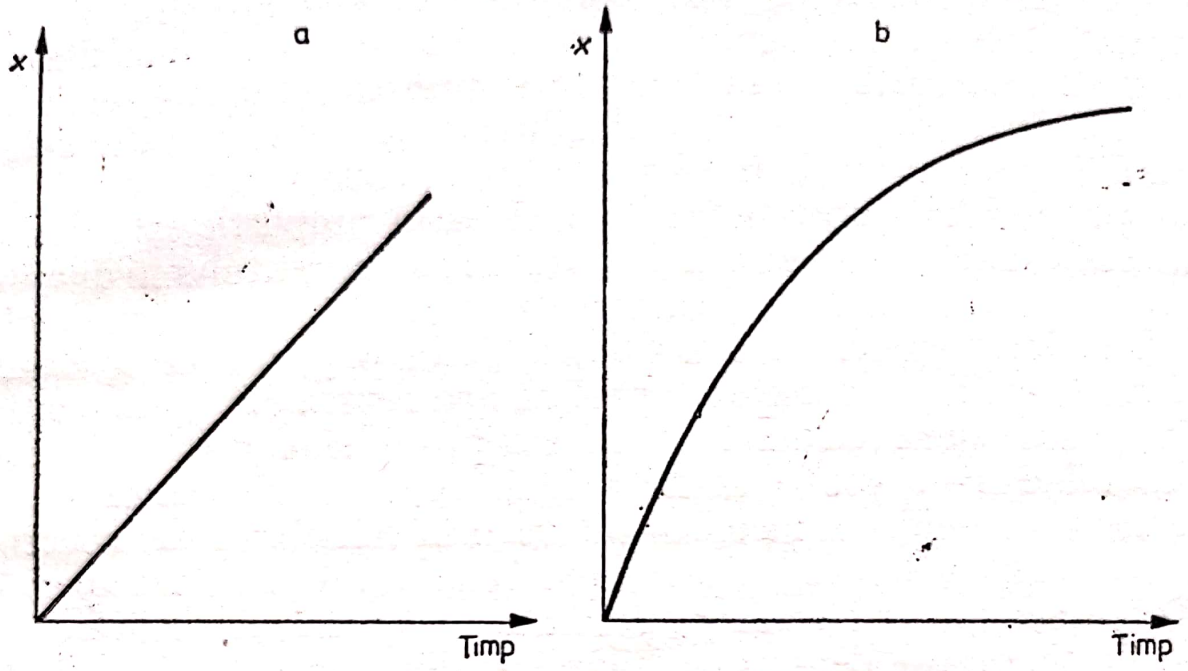


Fig. 1.1. Ordine de reacție. Ordinul zero *a* (stînga) și întîi *b* (dreapta)

zero), fie cu o viteză ce scade proporțional cu cantitatea de medicament absorbită (ordin întîi). Un exemplu clasic al absorbției cu viteză constantă este perfuzia intravenoasă continuă, în care viteza de pătrundere a medicamentului în sistemul vascular este fixă și menținută după dorință, stabilindu-se un echilibru dinamic al distribuției medicamentului în organism. Alte exemple de absorbție după cinetică de ordin zero mai sînt: mobilizarea medicamentelor insolubile din depozitele subcutane, sau intramusculare (protamin zinc insulina, procain-penicilina), aplicarea unor unguente pe piele, inhalarea unor gaze anestezice. Cu excepția exemplelor mai sus citate, atît prin administrarea enterală, cît și parenterală, majoritatea absorbției medicamentelor decurge după o cinetică de ordinul întîi, adică o fracțiune constantă de medicament este absorbită pentru fiecare interval de timp.

Desigur, în cursul testării unui medicament se fac, obligatoriu, studii cinetice pentru observarea timpului optim de absorbție în sînge (prin mai multe căi de administrare). Aceste studii se fac atît pe diferite specii de animale, cît și pe om, în experimentări preclinice. Aceste studii cinetice se concretizează în curbe, asemănătoare în prima parte celor din fig. 1.1, după care desigur urmează o scădere a medicamentului în timp, cu o pantă variabilă.

Un medicament va ajunge în fiecare organ cu o viteză determinată de irigarea sanguină a organului respectiv, de rapiditatea trecerii moleculelor prin capilare și prin membranele celulare.

În sînge, o proporție variabilă din totalitatea moleculelor unui medicament va fi legată de proteinele plasmatice și nu va putea difuza liber în țesuturi. Această proporție este destul de mare, dacă ținem seama de difuzia medicamentului în diferite compartimente fluide, de adsorbția sau partiția în particule subcelulare, suprafețe macromoleculare, depozite de grăsimi. Dacă luăm în considerare faptul că apa reprezintă aproximativ 80% din masa celulară și că receptorii sînt macromolecule conținînd 1—2 centri activi pentru acțiunea medicamentelor, la locul acțiunii, un medicament va fi în echilibru între concentrația moleculelor legate de receptori cu cele aflate în faza apoasă. Toate aceste considerente, ilustrate în fig. 1.2, sugerează că în realitate destul de puține molecule din concentrația inițială a unui medicament vor ajunge la receptorii specifici.

La acest tablou mai intervine și depozitarea compușilor liposolubili în depozite cu grăsimi neutre, cuprinzînd o fracțiune însemnată.

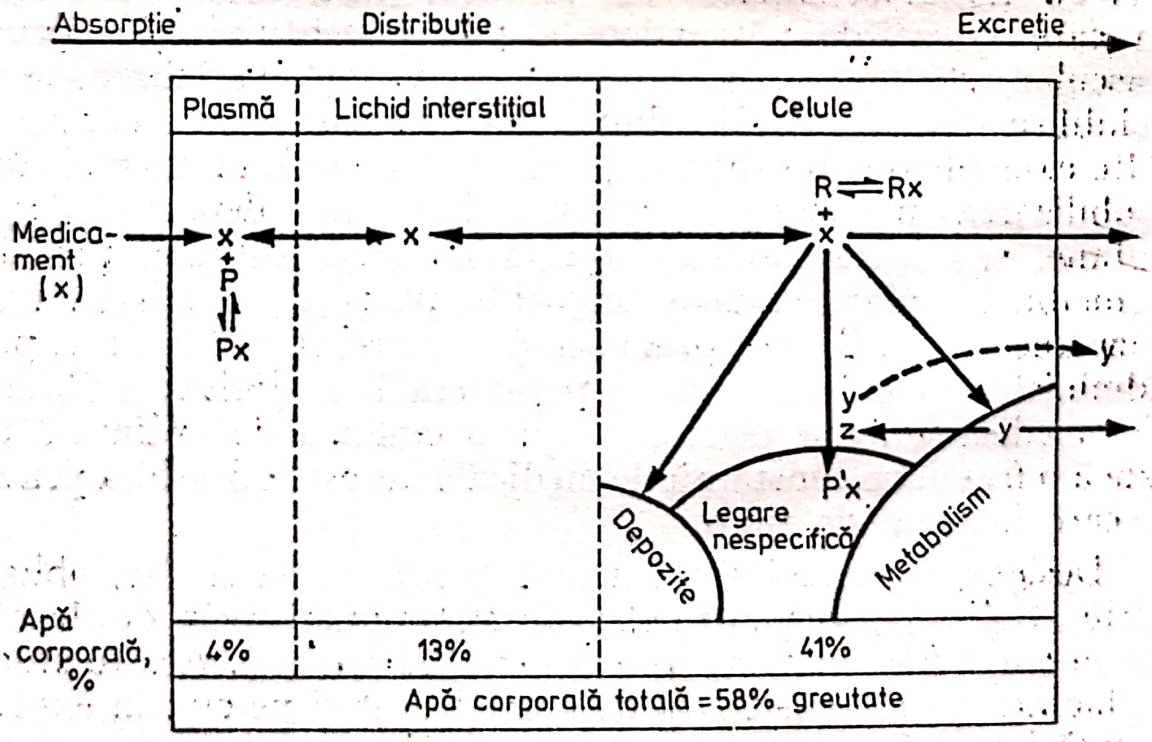


Fig. 1.2. Schema proceselor implicate în acțiunea unui medicament.

Legenda: liniile întrerupte reprezintă membrane biologice, numerele = procente din greutatea corporală din fiecare compartiment lichid, X = medicamentul în stare liberă, PX = complex medicament-proteine, P'X = complex medicament-receptori nespecifici, R = receptori, RX = = complex medicament receptori specifici, Y = produși metabolici.

1.2. Factori implicaţi în absorbţia medicamentelor

1.2.1. *Solubilitatea medicamentelor*

Solubilitatea medicamentelor joacă un rol destul de mare, atît în realizarea efectului terapeutic, cît şi în metabolizare. Astfel, această proprietate intervine în primul rînd în dizolvarea medicamentelor în lichidele tractului gastrointestinal în cazul unei administrări pe cale orală. În al doilea rînd, esenţial pentru pătrunderea unui medicament în organism este proprietatea de a fi liposolubil, pentru a putea străbate membranele formate din complexe lipidoproteice, iar în al treilea rînd metabolizarea medicamentelor în organism (cap. II) are drept scop schimbarea solubilităţii medicamentelor, prin transformarea lui în compuşi hidrosolubili, mai uşor eliminabili.

Numeroase studii [34, 49, 74] au arătat, că cu cît un medicament, sau în general un compus străin organismului, are un coeficient de partiţie mai mare faţă de raportul solvent organic/apă, cu atît pătrunderea lui este mai mare. Această constatare este valabilă atît pentru absorbţia pe cale orală, cît şi prin căi parenterale, pătrunderea în celule sau străbaterea unor bariere complexe cum ar fi placenta sau cea hematoencefalică.

Pentru multe medicamente, absorbţia este limitată de solubilitatea la *p*H-ul tractului gastrointestinal, etapa limitantă fiind viteza cu care medicamentul solid se dizolvă, şi în acest caz viteza va fi practic constantă pentru o perioadă de timp. Tot o absorbţie constantă se obţine prin aplicarea unor unguente pe piele datorită menţinerii unui gradient de concentraţie de-a lungul grosimii pielii şi solvirii în lipide complexe.

Importanţa solubilităţii în limitarea vitezei de absorbţie reieşe clar din tabelul II, prin compararea absorbţiei din colon cu coeficienţii de repartiţie cloroform/apă a unor barbituraţi. Compuşii cu solubilitate mai mare de 1,5 mg/ml sînt bine absorbiţi, comparativ cu cei avînd o solubilitate mai mică. Variaţia gradului de ionizare al barbituraţilor nu a constituit un factor în acest caz, deoarece la *p*H 6,8, existent în colon, toţi compuşii testaţi sînt în formă neionizată. Ca şi în cazul barbituraţilor, s-au găsit corelaţii asemănătoare, între solubilitatea în lipide şi viteza de absorbţie a unui mare număr de medicamente acide şi bazice [60]. Informaţii asupra penetrabilităţii unui medicament

TABELUL II

Compararea absorbției în colon cu partiția lipide/apă a unor barbiturați (după Schanker [61]).

Compus	*Procent absorbit*	*Coeficient de partiție cloroform/apă*
Barbital	12	0,7
Apobarbital	17	4,9
Fenobarbital	20	4,8
Acid alilbarbituric	23	10,5
Buthetal	24	11,7
Ciclobarbital	24	13,9
Pentobarbital	30	28,0
Secobarbital	40	50,7
Hexethal	44	100

Schimbarea concentrației % după perfuzie timp de 20 minute cu 0,2 ml/minut

se obțin prin măsurarea coeficientului de partiție între cloroform și apă tamponată la *p*H 5,3, valoare aleasă pentru intestinul subțire. Un coeficient mai mare de 0,5 indică o absorbție satisfăcătoare. Desigur, testările solubilității *„in vitro"* sînt obligatorii, dar nu suficiente. Astfel un medicament poate fi instabil în tractul gastrointestinal (ex. dibenamina reacționează cu conținutul intestinal), ori metabolizat de enzimele prezente în mucoasa intestinală (clorpromazina), sau printr-o foarte mare metabolizare hepatică, viteza eliminării este aproape egală cu cea a absorbției (gliceriltrinitrat absorbit sublingual).

S-au observat adesea efecte toxice în urma absorbției accidentale prin piele a unor compuși mult liposolubili folosiți în scopuri industriale (tetraclorură de carbon, compuși organofosforici). Prin analogie s-a introdus dimetilsulfoxidul (CH_3SOCH_3), miscibil cu apa și solvenții organici, care în proporție de 20% servește drept vehicul unor medicamente (anticolinergice, steroizi) permițînd o administrare variată.

1.2.2. *Teoria partiției în funcție de pH*

Medicamentele pot străbate membranele biologice, în special cea gastrointestinală, prin difuzie pasivă sau prin mecanisme specializate de transport. Dacă un medicament ar fi absorbit

printr-un mecanism specializat de transport, s-ar observa o tendinţă de saturare la concentraţii mari şi un efect inhibitor exercitat de medicamente cu structuri asemănătoare. Cum aceste efecte nu se observă decît în cazul unor medicamente cu structuri chimice asemănătoare unor compuşi naturali (vitamine, antimetaboliţi), rezultă posibilitatea existenţei unei absorbţii pasive. În acest caz, viteza de absorbţie a unui medicament ar depinde de solubilitatea lui în membrana lipidică, fapt demonstrat experimental.

Cunoştinţele acumulate asupra relaţiilor dintre viteza de absorbţie a unui medicament, constanta lui de disociere (pK_a) şi pH-ul la locul absorbţiei s-au concretizat în teoria partiţiei în funcţie de pH emisă de Brodie, Hogben şi Shore [63], verificată extensiv experimental [35, 36, 61, 62]. După această teorie, pătrunderea unui medicament prin bariera gastrointestinală este limitată doar la medicamentul în stare nedisociată, şi deci viteza de absorbţie va depinde de proporţia medicamentului în această formă, pe lîngă solubilitatea în lipide.

Relaţiile dintre constantele de disociere şi vitezele relative de absorbţie din stomac şi intestin a unor medicamente acide şi bazice sînt prezentate în tabelul III. Astfel un acid puternic (sulfosalicilic) complet disociat chiar la pH-ul sucului gastric nu este absorbit, în timp ce acizii slabi (salicilic) puţin disociaţi sînt absorbiţi semnificativ. În cazul bazelor puternice (chinina), chiar şi la pH 8, absorbţia lor este destul de mică iar la pH 1 este nulă. Tabelul III sugerează că numai medicamentele acide şi bazice slabe, puţin disociate, se absorb semnificativ din tractul gastrointestinal în sînge. Deci absorbţia unui medicament va fi crescută prin schimbări de pH în sensul creşterii proporţiei formei nedisociate, constatare valabilă de-a lungul tractului gastrointestinal.

Dealtfel a devenit evident că liposolubilitatea medicamentelor este mai mare pentru forma neionizată, explicîndu-se astfel de ce acizi slabi ca cei salicilici sau barbiturici, puţin ionizabili în mediu acid, sînt absorbiţi la nivelul stomacului. În schimb baze slabe ca amfetamine, chinidina, clorochin, puternic ionizate în mediu acid şi cu mică solubilitate, vor fi absorbite doar la nivelul duodenului [61].

În cazul medicamentelor neelectroliţi va predomina influenţa solubilităţii lor în lipide, iar la electroliţi, absorbţia se va face după gradul lor de ionizare şi liposolubilitatea formei

13415

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL III

Compararea absorbției unor medicamente la diferite valori de *p*H (după Schanker et al. [62]).

Medicament	pK_a	*Absorbția* % *p*H = 1 *stomac*	*p*H = 8	*p*H = 5,3 *intestin subțire*
Acizi				
5-Sulfosalicilic	puternic	0	0	0
5-Nitrosalicilic	2,3	52	16	9
Salicilic	3,0	61	13	60
Acetilsalicilic	3,5	35		20
Thiopental	7,6	46	34	55
Fenol	9,9	40	40	51
Baze				
Acetanilidă	0,3	36		42
Cafeină	0,8	24		36
Antipirină	1,4	14		32
Anilină	4,6	6	56	54
p-Toluidină	5,3	0	47	59
Chinină	8,4	0	18	15
Efedrină	9,6	0		7
Tolazolină	10,3	0		6
Procainamidă	puternic	0	0	0

Măsurătorile au fost efectuate în condiții diferite în stomac și intestin. În cazul stomacului medicamentul (1 mg) a fost dizolvat la *p*H indicat.

nedisociate. Această constatare deosebit de importantă, deși demonstrată experimental de mult timp, nu a fost acceptată decît destul de tardiv. Din acest motiv, relația dintre gradul de ionizare (α) și absorbția în diferite compartimente fluide cu *p*H diferit va fi ilustrată cu un alt exemplu.

Astfel gradul de disociere a unei molecule organice se determină în funcție de constanta de disociere pK_a și de *p*H-ul mediului, după ecuația Henderson-Hasselbach. Reamintim că $pK_a = -\log K_a$, iar α, gradul de disociere, reprezintă raportul moleculelor ionizate/numărul total de molecule.

Conform ecuației amintite, $pH = pK_a + \log \frac{(\text{bază})}{(\text{acid})}$ sau $\log \frac{(\text{bază})}{(\text{acid})} = pH - pK_a$ Cu aproximație, această ecuație poate

deveni: $\log C_m/C_i = pK_a - pH$ pentru acizi, şi $\log C_i/C_m = pK_a - pH$ pentru baze, în care C_m şi C_i reprezintă concentraţiile medicamentului — totală şi în stare ionizată.

Distribuţia la echilibru a unui acid slab (acid benzoic $pK_a = 4{,}2$) şi a unei baze slabe (anilină, $pK_a = 4{,}6$) în sisteme biologice cu pH diferite a putut fi demonstrată conform tabelului IV.

TABELUL IV

Echilibrul acidobazic al unui acid şi baze slabe la diferite valori pH (după [35])

Membrană lipoproteică	
Plasmă pH = 7,4 α	*Lichid cefalorahidian* pH = 7,4
$C_6H_5NH_3^+ \rightleftharpoons C_6H_5NH_2 = 0{,}002$	$C_6H_5NH_2 \rightleftharpoons C_6H_5NH_3^+ = 0{,}002$
$C_6H_5COO^- \rightleftharpoons C_6H_5COOH = 0{,}999$	$C_6H_5COOH \rightleftharpoons C_6H_5COO^- = 0{,}999$
Plasmă pH = 7,4	Intestin pH = 5,3
$C_6H_5NH_3^+ \rightleftharpoons C_6H_5NH_2 = 0{,}002$	$C_6H_5NH_{32} \rightleftharpoons C_6H_5NH_3^+ = 0{,}17$
$C_6H_5COO^- \rightleftharpoons C_6H_5COOH = 0{,}999$	$C_6H_5COOH \rightleftharpoons C_6H_5COO^- = 0{,}93$
Plasmă pH = 7,4	Stomac pH = 1
$C_6H_5NH_3^+ \rightleftharpoons C_6H_5NH_2 = 0{,}002$	$C_6H_5NH_2 \rightleftharpoons C_6H_5NH_3^+ = 0{,}999$
$C_6H_5COO^- \rightleftharpoons C_6H_5COOH = 0{,}999$	$C_6H_5COOH \rightleftharpoons C_6H_5COO^- = 0{,}002$

Exemplul de mai sus ilustrează încă odată importanţa pH-ului în distribuţia concentraţiilor unor medicamente în diferite compartimente lichide din organism. Un acid slab va fi uşor absorbit în stomac, ca şi în intestin, dacă valoarea pK_a este mai mare de 2, iar pentru baze mai mică de 10. Corelaţiile găsite experimental între absorbţia de-a lungul tractului gastrointestinal şi disociere sau pH sînt de mare importanţă practică şi teoretică.

1.2.3. *Influenţa masei moleculare*

Pe lîngă structura chimică, mărimea masei sale moleculare influenţează mult farmacocinetica unui medicament. Astfel, în primul rînd, în cazul injecţiilor intramusculare şi subcutane, viteza absorbţiei variază invers proporţional cu masa moleculară a medicamentului administrat. Acest fapt experimental

sugerează că absorbția în aceste cazuri este de fapt o difuzie limitată de bariera tisulară și de distanța medie dintre capilarele învecinate. În acest sens, injectarea hialuronidazei odată cu un medicament îi va ușura acestuia din urmă absorbția prin acțiunea sa asupra gelului țesutului conjunctiv interstițial.

În al doilea rînd, masa moleculară influențează de asemenea excreția biliară a unui compus. Astfel, s-a constatat că metaboliții formați în cursul metabolismului intermediar și care tind să fie excretați prin bilă vor avea o masă moleculară relativ mare, de aproximativ 500—1000 (tabelul V).

TABELUL V

Masele moleculare ale unor compuși excretați biliar

Compus	*Masa moleculară*	*Forma sa excretată*	*Masa moleculară a metabolitului*
Compuși endogeni			
Acid colic	409	glicolat	466
Bilirubină	585	diglucuronat	937
Pregnan-3,20-diol	321	glucuronid	497
Tiroxină	772	glucuronid	953
Compuși exogeni			
Acid iodopanic	571	glucuronid	
Bromosulfonftaleină	794	glucuronid conjugat	1020
Cloramfenicol	323	glucuronid	499
Morfină	285	glucuronid	461
Stilbestrol	268	glucuronid	445

Astfel în tabelul V sînt prezentați o serie de compuși endogeni și exogeni care sînt excretați biliari în urma unor reacții de conjugare în special cu acidul glucuronic. Substanțele care posedă o masă moleculară relativ mică (sub 300) tind să fie slab excretate prin bilă, de obicei mai puțin de 1% din concentrația administrată inițial.

Dacă la compușii simpli aromatici se fac substituiri în scopul creșterii masei moleculare, se va mări corespunzător și excreția lor biliară. Astfel iodurarea acidului 4-aminohipuric va crește eliminarea sa biliară cu 25%, iar a acidului antranilic cu 35%. Din studiul excreției biliare a unor serii de compuși aromatici

reiese că este necesară o masă moleculară de minimum 325, dar desigur apar şi diferenţieri în funcţie de specie.

Compuşii macromoleculari cu mase moleculare mai mari de 5000 nu sînt excretaţi biliar. Studii mai aprofundate au arătat că pentru a fi excretat biliar, un compus trebuie să aibă o anumită masă moleculară, dar şi o structură asemănătoare acizilor biliari, care să conţină o parte nepolară (de exemplu steroidică) şi una polară (rezidiu aminoacid).

În al treilea rînd, masa moleculară mai intervine şi în variaţia vitezei absorbţiei intestinale. Astfel, manitolul, eritriolul şi glicerina se absorb cu viteze strict proporţionale cu masa lor moleculară. Moleculele mici, lipoinsolubile ca apa deuterată sau ureea sînt absorbite intestinal mult mai rapid decît manitolul şi inulina, de asemenea lipoinsolubile. Aceste date experimentale pot constitui o dovadă pentru existenţa unor pori de-a lungul mucoasei intestinale.

1.2.4. *Absorbţia la nivelul tractului gastrointestinal*

Luînd în considerare influenţele solubilităţii în lipide şi ale *p*H-ului, absorbţia medicamentelor de-a lungul tractului gastrointestinal devine mai uşor de înţeles. După cum au arătat o serie de lucrări recente [36, 73], pe toată lungimea tubului digestiv membrana celulelor este compusă dintr-un strat de molecule lipidice întrerupte de pori conţinînd apă, a căror diametru este de aproximativ 4A°. Stratul de molecule are o structură foarte complexă, conţinînd lipide, proteine, lipoproteine şi polizaharide.

Substanţele liposolubile pătrund prin această barieră gastrointestinală prin difuzie pasivă, dizolvîndu-se în faza lipidică. Compuşii polari de dimensiuni mici, ca etanol, uree, apă, pătrund tot prin difuzie pasivă trecînd prin porii menţionaţi sau prin spaţiile intercelulare. În schimb pentru o serie de substanţe naturale, polare, ca aminoacizi, glucide, baze purinice şi pirimidinice, vitamine, sau pentru molecule mai mari hidrosolubile ori macromolecule, străbaterea barierei gastrointestinale necesită intervenţia unor mecanisme specializate, de transport activ, necesitînd un aport de energie [60, 14].

Sucul gastric este foarte acid (*p*H aproape de 1), iar cel intestinal aproape de neutralitate. Diferenţa de *p*H dintre

plasmă ($pH = 7,4$) și lichidele din tractul gastrointestinal va determina, local, dacă un medicament care este un slab electrolit va fi absorbit în plasmă sau dacă va fi excretat din plasmă în stomac sau intestin. Forma neionizată a medicamentului se va echilibra de cele două părți ale barierei gastrointestinale cu o viteză legată de solubilitatea în lipide. Dacă există o diferență de pH între cele două părți ale barierei, fracțiunea ionizată va diferi mult cantitativ, din cauza incapacității de a trece membrana. La echilibru, concentrația părții neionizate va fi aceeași în ambele părți, dar va fi mai mult medicament total de partea unde gradul de disociere este mai mare. Acest fenomen este cunoscut sub numele de „cursă de ioni" *(ion trapping)*. Energia necesară susținerii unui potențial neegal chimic este de același ordin de mărime ca cea necesară transportului activ.

Compușii lipidici, glucidici și proteici nu sînt absorbiți pînă nu sînt degradați enzimatic, iar alții ca insulina, histamina, adrenalina sînt distruse în tractul gastrointestinal. Dealtfel, modificări minore în formula unui medicament pot avea repercusiuni mari asupra cineticii. De exemplu, penicilina G, distrusă de aciditatea gastrică, are o absorbție duodenală variabilă [44], în schimb fenoximetilpenicilina (penicilina V) și fenoxietilpenicilina sînt absorbite în proporție de 40÷70 % din doza ingerată [58]. Un alt derivat al penicilinei, carbenicilina, este distrusă de aciditatea gastrică și se administrează numai parenteral [20], în schimb un produs înrudit, indanilpenicilina poate fi administrat oral [19]. În cursul pătrunderii prin bariera gastrointestinală, ultimul compus se scindează și în sînge se va găsi doar carbenicilina.

La nivelul *bucal*, mucoasa respectivă permite ca unele medicamente să fie absorbite deja la acest nivel. Acest fapt prezintă avantajele rapidității de acțiune și al obținerii unui nivel sanguin înalt. De aceea această cale este folosită în crize de angor prin tratament cu trinitrină [33] sau azotați organici [59]. Izoproterenolul, inactivat în ficat, unii steroizi sau enzime distruse de aciditatea gastrică sînt absorbite la acest nivel în mare parte [33].

În *stomac*, acizii organici sînt bine absorbiți, deoarece la pH-ul sucului gastric sînt aproape complet nedisociați. Bicarbonatul de sodiu produce o mișcare a absorbției acizilor organici cu pK_a acid printr-o ionizare parțială. Bazele slabe se vor acumula în stomac prin mecanismul „*ion trapping*" descris,

mimînd astfel un proces secretor, mai ales în urma unei administrări îndelungate. Bazele tari ($pK_a > 5$) se acumulează în stomac, întrecînd de mai multe ori concentraţia sanguină, în timp ce bazele slabe (tabelul III) prezintă concentraţii egale în plasmă şi sucul gastric. Absorbţia gastrică este rapidă, antrenînd concentraţii plasmatice crescute în mai puţin de o oră de la administrare. În schimb nivelul plasmatic astfel obţinut este de scurtă durată.

Absorbţia la nivelul *intestinului subţire* se face mai ales în partea proximală, de îndată ce condiţiile de *p*H au devenit favorabile. Se absorb bine acizi organici cu pK_a mai mare de 3 şi baze slabe cu pK_a sub 8, tabelul III. Absorbţia antibioticelor are loc mai ales la nivelul duodenului aşa cum au arătat Pindell şi colaboratorii în cazul tetraciclinelor [56]. Doar vitamina B_{12} pare să fie absorbită la nivelul ileal în prezenţa factorului intrinsec produs în stomac şi a calciului [33].

Colonul este principalul sediu al reabsorbţiei apei prin absorbţie activă şi secreţie de electroliţi. Studiile lui Schanker [62] şi Binder [15] au arătat că medicamentele se absorb în această porţiune a tractului digestiv în aceeaşi măsură ca şi în rest. După Evered [27] se poate face o bună comparaţie între absorbţia la nivelul colonului cu cea din cavitatea bucală. Barbituricele, antipirina, acizii organici sînt unele din medicamentele absorbite la acest nivel [13].

Înţelegerea fenomenelor implicate în absorbţia medicamentelor au permis găsirea unor tehnici destinate să crească absorbţia prin mărirea vitezei de dizolvare. Astfel formele saline ale unor medicamente ca barbituraţi [3], sulfonamide [48], tolbutamidă [50] cresc viteza de dizolvare furnizînd un strat de tampon cu *p*H ridicat în jurul cristalelor. Aspirina este comercializată sub formă de sare de calciu. Reducerea dimensiunilor cristalelor creşte dizolvarea prin mărirea suprafeţei de contact. În cazul novobiocinei [46] şi a metilprednisolonului [8] folosirea unor forme amorfe a permis mărirea dizolvării. Includerea unor surfactanţi în preparatele unor medicamente ca sulfisoxazol [38], secobarbital [43], griseofulvina [11] măresc absorbţia, probabil prin dizolvarea medicamentului în interiorul hidrofob al micelei surfactantului. Dizolvarea decurge fie prin umectare cu sucul gastric, fie prin precipitarea medicamentului ca o dispersie fină. În cazul polymixinei, nistatinei, adăugarea surfactanţilor are efect opus, de micşorare a absorbţiei [64].

1.3. Distribuția și transportul medicamentelor

Odată ajunse în sînge, soarta medicamentelor devine destul de variată și în general mai puțin cunoscută decît absorbția, metabolizarea și eliminarea lor. În primul rînd, medicamentele se leagă reversibil de proteinele plasmatice, cu o durată variabilă ce va influența în multe cazuri acțiunea lor terapeutică. Această combinare cu proteinele plasmatice va fi tratată în continuare.

Din sînge, străbătînd pereții capilarelor, medicamentele trec în lichidul interstițial. Pereții capilarelor se comportă ca o membrană cu permeabilitate selectivă. Apa și electroliții, ca și molecule cu mase moleculare sub 400 traversează peretele capilar prin difuzie. Substanțele liposolubile trec pe toată suprafața capilarelor cu o viteză dependentă de coeficientul de partiție lipide/ apă. Pentru unele substanțe, cu mase moleculare medii, pătrunderea se face prin transport activ. În general difuzia medicamentelor prin peretele capilarelor este influențată de numărul vaselor, de diametrul lor, de gradul de oxigenare al țesuturilor și bineînțeles de structura și proprietățile fizico-chimice ale substanțelor.

Se cunosc unele aspecte particulare ale difuziei medicamentelor. Astfel substanțele foarte ionizate la *p*H-ul plasmei trec foarte greu în lichid cefalorahidian, cum sînt derivații cuaternari de amoniu cu acțiune gangliopegică, unele oxime. Bariera hematoencefalică este permeabilă pentru substanțe liposolubile puțin disociate (tiopental). Meningele inflamat este mai permeabil decît în stare normală. Concentrația sanguină la fetus este la același nivel cu cel al mamei și faptul că nu are sisteme enzimatice de metabolizare evită acumularea cataboliților cu polaritate mare.

În cursul distribuirii medicamentelor în organism se pot distinge:

a) Difuzia uniformă în toate țesuturile (alcool, narcotice).

b) Distribuția selectivă a multor medicamente în anumite țesuturi datorită diferențelor în permeabilitatea celulară. Astfel iodul se acumulează în tiroidă, sărurile de mercur în rinichi, calciul și fosforul în oase.

c) Difuzia inițială a unor medicamente în funcție de structura lor chimică, urmată apoi de o redistribuire observabilă în cazul barbituricelor cu acțiune de scurtă durată (hexobarbital).

Scanned with OKEN Scanner

Ajunse în țesuturi, medicamentele se fixează reversibil, uneori ireversibil, de structurile lipoproteice. Fixarea reversibilă permite eliberarea treptată a substanței active, cu persistență variabilă a efectelor farmacodinamice, urmată apoi de metabolizare și eliminare. Fixarea ireversibilă, mai rar întîlnită, s-a observat în cazul depozitării arsenului în piele și fanere, a argintului în mucoase.

În metabolismul medicamentelor ficatul deține un rol primordial, la acest nivel fiind localizat sistemul enzimatic hidroxilant din microzomi. O substanță ajunsă în ficat poate fi excretată prin bilă, netransformată în intestin unde este eliminată prin fecale, sau reabsorbită prin mucoasa intestinală, realizîndu-se astfel un ciclu enterohepatic. Alte substanțe trec din hepatocit în limfă sau în sînge, reluînd circuitul în sistemul vascular. Aceste posibilități sînt larg dominate de structura chimică a medicamentului, solubilitatea în lipide [12] etc.

d) Stocarea în țesutul adipos se produce în special în cazul unor medicamente foarte liposolubile (tiopentan, pentobarbital). Depozitarea poate fi de scurtă durată, cînd medicamentele se reîntorc în sînge. Un astfel de mecanism stă la baza acțiunii tiobarbituricelor, în care se obține foarte rapid o concentrație mare în creier, dar efectul farmacodinamic nu durează mult datorită scăderii concentrației eficace. Medicamentul însă rămîne în sînge și țesuturi cîtva timp, dar la o concentrație ineficace. Deci va fi posibilă menținerea efectului hipnotic prin administrarea unor cantități mai mici, inferioare celei inițiale. În cazul altor substanțe, stocarea poate fi foarte îndelungată, cum sînt dibenamina, dar mai ales unele insecticide ca DDT, hexaclorobenzen sau estrogenii folosiți la îngrășarea animalelor. Depozitarea se face prin simpla partiție a moleculelor neionizate între lipide și apă.

Rinichii posedă o mare afinitate pentru diureticele mercuriale și, dealtfel s-a și observat o bună corelație între conținutul renal în aceste medicamente și intensitatea răspunsului diuretic. O acumulare excesivă duce însă la o toxicitate tipic mercurică, caracterizată prin alterarea funcției renale tubulare, cît și la distrugeri tisulare. Concentrarea diureticelor mercuriale în rinichi este de 100 ori mai mare decît nivelul plasmatic datorită marii afinități a mercurului pentru grupările sulfhidril proteice [10]. Datorită marii lor reactivități grupările sulfhidril pro-

Scanned with OKEN Scanner

teice din rinichi și ficat vor interacționa și cu bismut sau arsen în cantitate mare, producînd adesea leziuni fatale.

Sistemul reticuloendotelial constituie un alt loc important pentru depozitarea unor substanțe, în special cu caracter coloidal. În acest sens s-a renunțat la folosirea bioxidului de thoriu, un bun agent de contrast în roentgenografie, din cauza marii afinități pentru proteine, unei eliminări încete și a riscului unei posibile carcinogeneze. Izotopii radioactivi tind să se acumuleze în diferite organe, cum sînt Sr^{90} în oase, I^{131} în tiroidă etc., mimînd distribuția calciului (în primul caz) sau al elementului natural.

1.3.1. *Legarea medicamentelor cu proteine*

Medicamentele, ca și majoritatea compușilor străini organismului, sau chiar endogeni (bilirubina, hormoni), se leagă cu proteinele plasmatice sau tisulare; în această formă ele nu pot trece prin membranele biologice. Acești complecși, foarte variați ca natură, au un mare rol în acțiunea și metabolizarea medicamentelor, așa încît vor fi studiați aparte.

A. Proteinele plasmatice.

În urma administrării orale sau parenterale, medicamentele ajung în sînge, grație căruia sînt difuzate în întreg organismul. La un om de 70 kg, ce are un volum al sîngelui de aproximativ 6 l, injectarea unei substanțe, ce nu difuzează în lichidul interstițial (albastru Evans), în concentrație inițială de 1 g, va da un nivel sanguin de 150 mg/l.

Substanțele ionizate sînt transportate de sînge ca atare, în schimb cele nedisociate pot circula sub formă liberă, dizolvate în plasmă sau legate de proteinele plasmatice și ulterior de cele tisulare.

Majoritatea medicamentelor sînt transportate de albumină prin combinații reversibile, în care sînt implicate legături polare sau de tip van der Waals. O structură chimică ce asigură o liposolubilitate oferă în general posibilități mai mari de legare cu proteinele plasmatice. Medicamentele cu caracter acid (fenilbutazona, anticoagulantele cumarinice, sulfonamidele, salicilații) sînt legate de albumină în proporție mare. Centrii de combinare activi ai albuminei nu sînt suficient cu-

noscuți și nu sînt în număr mare, dar par să aibă caracter diferit. Astfel ionii au afinități diferite după natura grupei de care se leagă, manganul pentru grupări sulfhidril, zincul și cadmiul de grupările imidazol; pentru anioni, ordinea afinității pare să fie bicarbonat < acetat < cloruri < citrat < nitrat [39]. În cazul compușilor organici, endogeni sau exogeni (medicamente), centrul activ de legare al albuminei pare să fie același. Astfel se explică deplasarea unor compuși endogeni ca bilirubina, cetoacizii, hormonii din combinarea cu albumină de către unele medicamente acide, în mod competitiv. O combinație mai stabilă cu albumina implică și alte grupări chimice libere, cum ar fi cele sulfhidril în cazul Antabuse (disulfurătetraetiltiuram, ASSA); rezultînd prin scindare DDTC, elementul activ:

Protein-SH + ASSA → Protein-SS-A + Dietilditiocarbamat (DDTC)

Pe lîngă liposolubilitate, combinarea medicamentelor cu proteinele mai este influențată de *p*H (prin ionizarea proteinei, sau medicamentului) de specie (sulfonamidele dau legături mai stabile la om [29]), vîrstă sau natura proteinei. În fig. 1.3 sînt prezentate fracțiunile proteinelor plasmatice, separate electroforetic și principalii compuși cu care se leagă în combinații reversibile. Se observă spectrul larg de legare al albuminei în comparație cu celelalte fracțiuni, mai ales față de gamma globuline, de care par să se lege doar unele sulfonamide [22] și coloranți ca bromosulfonftaleină [7].

Legarea reversibilă a medicamentelor de proteine necesită nealterarea structurii terțiare a proteinei. Din această cauză metodele clasice chimice, care necesită deproteinizarea plasmei, nu sînt adecvate studiului acestor combinații, recurgîndu-se la metode biologice sau fizico-chimice. Diluția plasmei favorizează disocierea combinației, deoarece reduce concentrația medicamentului liber în echilibru cu partea legată proteic [30].

Dacă un medicament se combină cu o proteină avînd un anumit număr de centri, despre care presupunem că au aceeași afinitate și între ei nu există fenomene de cooperativitate, legea acțiunii maselor va indica relația cantitativă între con-

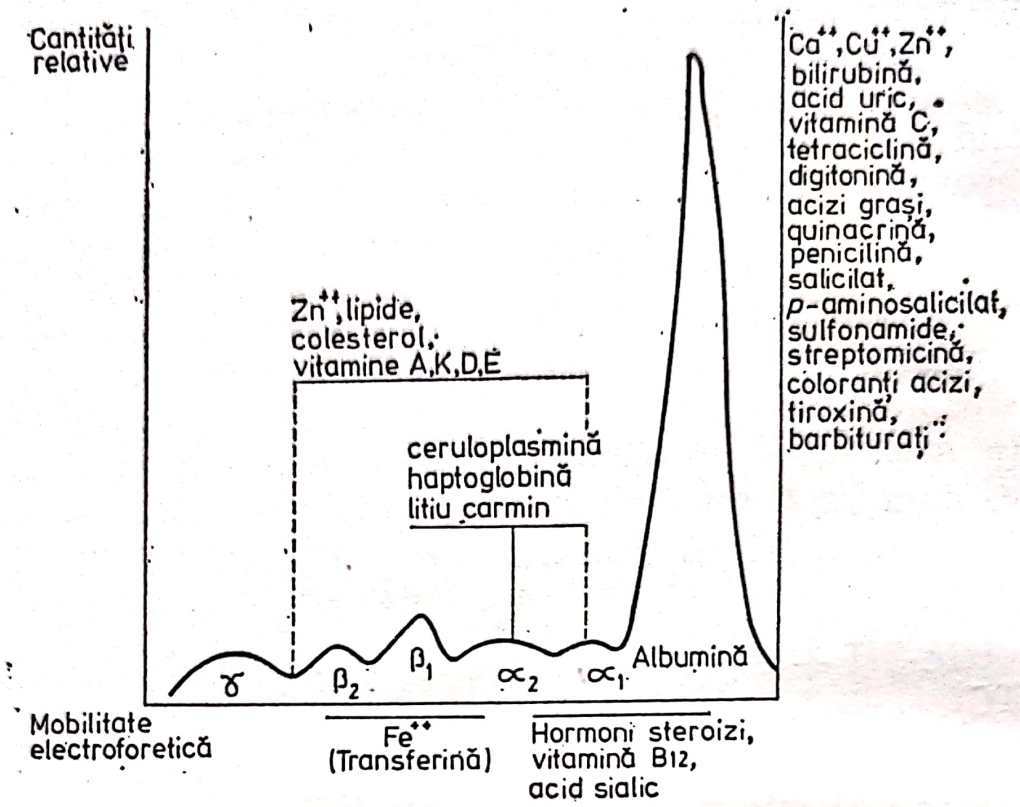


Fig. 1.3. Combinarea unor compuşi cu diferitele fracţiuni ale proteinelor plasmatice

centraţia medicamentului liber (X) şi legat de o proteină (PX) cu n centri activi:

$$\frac{(PX)}{nP} = \frac{(X)}{K + (X)},$$

în care K este constanta de disociere, iar r, raportul concentraţiei medicamentului legat/mol de proteină, va fi:

$$r = \frac{(PX)}{P} = \frac{n(X)}{K + (X)}$$

Relaţia r faţă de (X) indică o hiperbolă identică cu izoterma de absorbţie, cu saturare la concentraţii mari (fig. 1.4).

Studiile cantitative pornind de la aceste relaţii devenite clasice [31, 45] au indicat că, în cazul unei mari afinităţi (K mic) şi a unei concentraţii mici de medicament, acesta va fi în totalitate legat. Toate medicamentele la o concentraţie suficient de mare vor satura toate posibilităţile de legare, iar

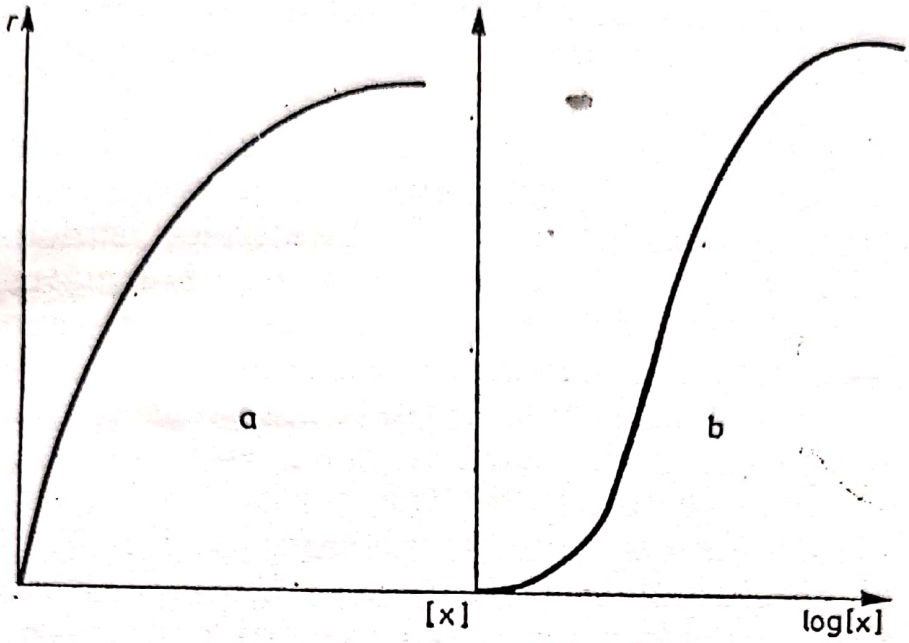


Fig. 1.4. Relaţia dintre concentraţia medicamentului (x) şi numărul de moli per mol de proteină (r), după [36]; a) ca isotermă de absorbţie, b) în funcţie de logaritmul dozei

la concentraţii foarte mari, partea majoră va fi în stare liberă. Cînd concentraţia medicamentului scade datorită metabolizării şi eliminării, fracţiunea legată va creşte în raport cu concentraţia totală. O combinare foarte stabilă poate duce la reducerea vitezei de metabolizare a medicamentului, cum ar fi acetilarea sulfonamidelor [5].

Fixarea medicamentelor de proteinele plasmatice contribue la menţinerea lor în spaţiul intravascular, întîrziind trecerea lor prin barierele organismului sau în celulă. Datorită saturării centrilor de legare ai albuminei s-au observat adesea competiţii pentru combinare între medicamente sau între medicamente şi unii compuşi naturali. Astfel administrarea în scop profilactic a unor medicamente (sulfonamide, antibiotice) măreşte de şase ori incidenţa icterului nuclear al nou-născuţilor, datorită deplasării bilirubinei din combinarea cu albumina [53]. Datorită unei mai mari afinităţi bromosulfonftaleina deplasează bilirubina şi sărurile biliare din combinaţia cu albumina [40], oleatul poate lua locul tiroxinei, iar unele medicamente antireumatice ca fenilbutazona deplasează corticosteronul, mărindu-i concentraţia în stare liberă [18]. Interacţii între medi-

camente pentru fixarea pe albumină se mai cunosc în cazul salicilaților [4], warfarinei (anticoagulant cumarinic) [69], sulfonamide [37].

Insuficiențele congenitale sau dobîndite ale proteinelor plasmatice, mai ales ale albuminei influențează mult efectul farmacodinamic al salicilaților, barbituricelor, sulfonamidelor, vitaminei K, unele antibiotice. De aceea se iau măsuri de precauție în cazul bolnavilor hepatici, intoxicați, cu hemosideroză, sau la nou-născuți. Fenilbutazona este contraindicată în asociere cu anticoagulante cumarinice sau la diabetici tratați cu sulfamide hipoglicemiante. Mărirea capacității de transport a sîngelui se poate realiza prin transportori artificiali ca polivinilpirolidonă, dextran sau complexanți ca EDTA, dimercaptopropanol, penicilamină [21]. Invers, blocarea terapeutică a capacității de transport în scopul folosirii unor doze mai scăzute de medicament se folosește de exemplu prin administrarea prealabilă de sulfamide pentru prelungirea efectului narcotic al tiopentalului [24].

B. Legarea medicamentelor de proteinele tisulare este dependentă de afinitatea reciprocă, producînd în unele cazuri concentrații locale masive (clorochin în iris, chinacrină în plămîni etc.). Pentru a explica acțiunea terapeutică, Ehrlich a emis în 1892 ipoteza existenței în celule a unor „receptori" care interacționează specific cu grupările active ale diferitelor substanțe. Astăzi, receptorii sînt concepuți ca macromolecule complexe dispuse pe suprafața sau în interiorul celulei pe care se fixează reversibil sau ireversibil diferite substanțe, rezultînd o acțiune farmacodinamică. Legăturile complexului receptor-medicament poate varia de la 20—100 kcal/mol, greu disociabile de tip covalent, pînă la legături de tip ionic (aproximativ 10 kcal) sau slabe, de tipul punților de hidrogen, forțelor van der Waals (sub 5 kcal/mol).

Nu există o teorie unitară a interacțiilor medicament-receptori proteici, deși s-au realizat progrese mari atît teoretic (exemplu interpretarea alosterică a acțiunii medicamentelor) [16], cît și experimental, prin măsurarea unor constante de interacție [52, 71] sau identificarea unor aminoacizi implicați în centrii de combinare activi ai receptorilor macromoleculari. În acest caz se folosesc metode chimice utilizate în descifrarea secvenței aminoacizilor din proteine simple sau purificate.

1.3.2. *Medicamente și transportul prin membrane*

Acest titlu indică un domeniu nou, fascinant prin numeroasele date în favoarea acțiunii multor medicamente la nivelul membranelor celulare sau subcelulare. Oricum, pentru a-și exercita acțiunea farmacodinamică, un medicament trebuie să străbată o serie de bariere și membrane cu structuri diferite și complexe. Barierele sînge-creier, sînge-lichid cefalo-rahidian și placentară formează o categorie deosebită de membranele celulare, prin care medicamentele trec prin difuzie în funcție de dimensiunea moleculară și de gradul de liposolubilitate. S-a observat însă și existența unui transport activ pentru compuși naturali, analogi sau substanțe puțin liposolubile cum ar fi sărurile cuaternare de amoniu.

Spre deosebire de barierele menționate, cu o structură foarte complexă și cuprinzînd o vascularizație aparte, membranele celulare par mai simple, concepția actuală fiind bazată pe ipoteza lui Danielli care admite existența a patru pături moleculare: două lipidice mijlocii cu moleculele orientate perpendicular pe suprafața membranei avînd la exterior și interior cîte o pătură monomoleculară proteică. Ca și în cazul membranei gastrointestinale substanțele chimice traversează acest mozaic de suprafețe lipidoproteice, fie prin partiție lipide/apă, sau în cazul unor molecule neutre prin pori în funcție de mărimea moleculei. Pentru ioni, membranele au o permeabilitate selectivă. Procesul difuziei medicamentelor prin membrane este influențat și de gradul de disociere, în sensul unei pătrunderi mai mari pentru forma nedisociată, mai liposolubilă. Difuzia simplă se datorește unui gradient de concentrație între cele două fețe ale membranei. După cunoscuta relație a lui Frick, viteza difuziei $= K \frac{A(c_1 - c_2)}{d}$, în care A = suprafața necesară transferului, $c_1 - c_2$ = gradientul de concentrație, d = grosimea membranei, iar K este constanta de difuzie legată de masa moleculară, configurația spațială și gradul de ionizare al substanței.

Unele medicamente produc modificarea polarizării membranei celulare. Astfel, în repaus, membrana este polarizată, avînd pe partea externă sarcini electrice pozitive, iar pe cea internă sarcini negative. Potențialul de repaus este de aproximativ 90 mV, ca rezultat al activității metabolice și schimburilor

de ioni între cele două suprafețe ale membranei. Depolarizarea membranei declanșează potențiale variind între 110—120 mV. Acetilcolina și substanțele parasimpatice se fixează direct pe receptorii colinergici ai membranei postsinaptice și produc depolarizări reversibile. Substanțele gangliopegice (hexametoniu, mecamilamină) fixîndu-se pe aceiași receptori împiedecă fixarea acetilcolinei și apar efecte inhibitorii prin blocarea polarizării membranei. Curarizantele acetilcolinomimetice, din contra, produc o depolarizare prelungită.

Acțiunea medicamentelor mai sus citate asupra membranei celulare este binecunoscută, în schimb multe medicamente se pare că interacționează fie direct asupra membranei, fie asupra transportului activ ionic [25].

Tabelul VI sugerează doar larga gamă a medicamentelor, care produc efecte la nivelul membranelor. Desigur că aceste medicamente pot acționa și la alte nivele, fiind dificil de deosebit la multe medicamente acțiunea principală de efectele secundare. Un exemplu elocvent este furnizat de clorproma-

TABELUL VI

Efectul unor compuși asupra transportului prin membrane

Substanța	*Efecte posibile*	*Referință*
Glicozide cardiace	Inhibiția sistemului Na^+, K^+-ATPază	[17]
Chinidină	Inhibiția sistemului Na^+	[72]
Hormon tireotrop (TSH)	Stimularea sistemului Na^+, K^+-ATPază	[17]
Acetilcolină	Inhibiția sistemului Na^+, K^+-ATPază	[17]
Hormon neurohipofizar	Crește dimensiunea porilor	[72]
Histone, ganglioside	Controlul transportului activ	[72]
Clorpromazină	Membrana mitocondrială	[65]
Antibiotice	Modifică permeabilitatea K^+, H^+	[6]
Anestezice generale	Modifică structura lipoproteică	[47]
Agenți cholangiografici	Modifică sistemul de transport hepatic	[9]
Sulfonamide nesubstituite (Diamox)	Indirect, prin inhibiția anhidrazei carbonice	[28]
Anestezice gaze	Modifică structura apei legate	[2,55]
Tranchilizanți, Antihistaminice	Acționează ca agenți tensioactivi	[42,66]
Propanolol	Membrana mitocondrială	[26,42]
Poliamine	Combinare cu sarcini negative	[67]

zină și propanolol, molecule liofilice încărcate pozitiv cu mare afinitate pentru membrane de diferite tipuri. După Kwant și Seeman acțiunea stabilizatoare asupra membranelor oferă acestor substanțe un rol de anestezic local [41]. Așa cum se va arăta în cap VII, clorpromazina prezintă multe acțiuni terapeutice, acționînd asupra numeroaselor sisteme enzimatice în calitate de donor de electroni.

1.4. Eliminarea medicamentelor

1.4.1. *Viteza eliminării medicamentelor*

Eliminarea din organism reprezintă ultima etapă a farmacocineticii. Un medicament se poate elimina pe mai multe căi în proporții diferite. În general substanțele hidrosolubile se elimină prin rinichi, cele mai puțin solubile administrate pe cale orală se elimină prin tubul digestiv, iar cele gazoase și volatile prin plămîni. Unele medicamente se elimină netransformate, fiind active la nivelul căii de eliminare (antibiotice, benzoat), dar cele mai multe suferă transformări chimice studiate în cap. II.

În funcție de mecanismul eliminării, dispariția unui medicament din organism poate fi de ordinul zero (viteză constantă) sau de ordinul întîi (viteză exponențială), exemplificate în fig. 1.1. Eliminarea de ordinul întîi este o regulă generală, filtrarea glomerulară fiind un exemplu tipic, ca și absorbția prin mucoasa gastrointestinală sau sechestrarea medicamentelor în țesuturi. Toate aceste procese sînt de ordinul întîi deoarece fiecare moleculă are o probabilitate fixă de a fi transportată într-un timp dat. Doar în cazul unei saturări, pentru concentrații mari, eliminarea devine de ordinul zero. Astfel în secreția tubulară renală, pentru fiecare medicament există o capacitate tubulară de transport maximă T_m. Dacă nivelul plasmatic al unui medicament este foarte mare, depășind valoarea corespunzătoare T_m se va obține o cinetică de ordinul zero, pînă ce concentrația scade sub nivelul saturației, cînd eliminarea va fi proporțională cu cantitatea medicamentului din circulație. Același principiu se aplică și la secreția medicamentelor prin bilă, în care fiecare medicament este caracterizat printr-o valoare T_m.

Scanned with OKEN Scanner

Desigur, un factor principal ce influenţează eliminarea este metabolizarea lor în ficat sau în alte ţesuturi. O reacţie cuplantă (de exemplu reducerea $NADP^+$) este limitantă sau pentru concentraţii de medicament aproape de saturare va apărea o cinetică de pseudoordin întîi, cînd eliminarea rămîne constantă şi numai concentraţia substraturilor S va influenţa viteza de reacţie. Astfel pentru concentraţii aproape de saturare, viteza eliminării v va fi obţinută prin relaţia:

$$v = \frac{dS}{dt} = \frac{S}{(K + S)} \cdot V_{max},$$

în care $v \ll V_{max}$ astfel că $S \ll K$ şi deci $v = \frac{dS}{dt} = \frac{V_{max}}{K} \cdot S$, care este evident o ecuaţie de gradul întîi deoarece V_{max}/K este o constantă. Iniţial eliminarea metabolică a medicamentelor poate fi de gradul zero sau întîi, în funcţie de concentraţie şi de afinitatea medicamentelor pentru enzimele metabolizante. La concentraţii mici, eliminarea medicamentelor este de ordinul întîi.

În cazul depozitării în ţesuturile grase, irigarea slabă sanguină limitează viteza sechestrării, chiar dacă coeficientul lipide/apă este foarte mare. Notînd cu X, concentraţia totală a medicamentului, la timpul t, cu X_0, concentraţia iniţială a medicamentului şi cu K_e constanta vitezei eliminării, concentraţia totală X va fi dată de $X = X_0 e^{-Ket}$ sau $\log X = \log X_0 - K_e t/2{,}3$. Aşa s-a introdus noţiunea de $t_{1/2} = 0{,}693/K_e$ sau timpul de semiviaţă *(biological half life)*, util în a cunoaşte în cît timp un medicament atinge jumătate din concentraţia iniţială administrată. Pe coordonate semilogaritmice, scăderea concentraţiei plasmatice a unui medicament este aproape liniară în timp [48].

Calea de administrare a medicamentelor influenţează desigur foarte mult viteza eliminării, aşa cum este sugerată în fig. 1.5.

După cum s-a arătat la partea dedicată absorbţiei, chiar prin administrare per os se caută să se instaleze un nivel plasmatic eficace, ilustrat prin apariţia unui platou pentru o perioadă de timp. Această constatare a determinat pe Goldstein şi colaboratorii [32] să emită principiul „platoului", aplicabil în orice procese în care viteza intrării într-un sistem este constantă, iar cea a eliminării este exponenţială. Conţinutul sistemului (substanţa introdusă) va atinge un echilibru ilustrat printr-un platou determinat de viteza eliminării. De exemplu, digitala se elimină foarte greu din organism (aprox. 10 % pe zi),

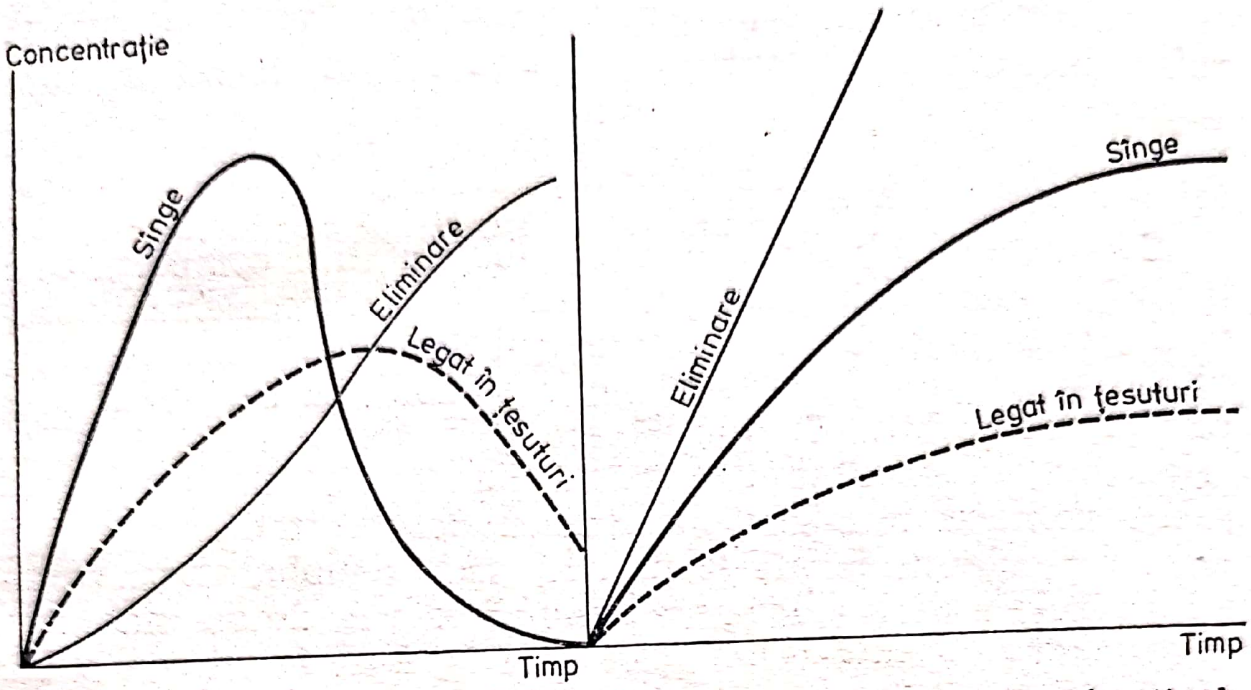


Fig. 1.5. Variația concentrației unui medicament în organism, în funcție de calea de administrare; (stînga) per os, (dreapta) perfuzie intravenoasă.

semiviața fiind de 7 zile. Dacă se administrează de la început doza de întreținere, nivelul eficace se va obține în cîteva săptămîni, acesta fiind dealtfel aproape de nivelul toxic. Așa că „digitalizarea" constă în administrarea unei doze mai mari, pînă ce electrocardiograma și testele clinice indică atingerea nivelului eficace, după care se continuă administrarea unor doze mult mai mici de întreținere și deci de menținere a platoului. Datorită unei eliminări încete (metabolizare lentă, combinare prea mare cu proteine tisulare) se produce uneori o toxicitate prin cumulare, foarte periculoasă. Astfel de exemple sînt atabrina [68] antimalaric, bromurile ce dau efecte neuropsihice și dermite la concentrații mai mari de 20 meq/l [70], ioni metalici poluanți (Pb, Hg).

1.4.2. *Căi de eliminare*

1.4.2.1. Eliminarea pe cale renală

Eliminarea pe cale renală este cea mai răspîndită cale de eliminare a medicamentelor, efectuîndu-se prin filtrare glomerulară (mai ales pentru substanțe cu masă mică moleculară), prin

secreţie tubulară sau prin ambele mecanisme. Filtrarea glomerulară produce un ultrafiltrat ce conţine medicamente în stare liberă sau metaboliţi în concentraţie aproximativ egală cu cea din plasmă. În secreţia tubulară se deosebesc transferul tubular pasiv şi activ.

Ca şi alte membrane biologice, tubii distali se comportă ca o barieră lipoproteică permiţînd transferul moleculelor liposolubile, neionizate. De aceea compuşii liposolubili sînt reabsorbiţi în sînge, pe cînd cei mai puţin solubili, ca barbitona, sînt parţial reabsorbiţi. Compuşii care sînt mai mult ionizaţi în urină decît în sînge tind să treacă din sînge în filtratul glomerular. Excreţia renală a medicamentelor-electroliţi slabi este mult dependentă de *p*H (cap. 1.1.). De exemplu, viteza eliminării renale a derivaţilor amfetaminici este de 20 ori mai mare la oamenii care au o urină acidă (*p*H 5), decît la cei cu o urină alcalină [57]. Din cauza reabsorbţiei, un medicament liposolubil care nu a fost metabolizat într-unul hidrosolubil va rămîne mai mult timp în circulaţie.

Transportul tubular activ pare să fie destul de complex, deosebindu-se mecanisme pentru secreţia acizilor organici puternici şi altul pentru baze organice puternice, ambele situate în tubii proximali. Compuşii eliminaţi prin transport activ sînt puternic ionizaţi şi pot fi transferaţi în urina tubulară contra unui gradient mare de concentraţie. Mecanisme asemănătoare secretorii pentru acizi organici există şi în ficat sau alte organe, dar de amploare mai mică. Substanţele eliminate prin transport activ competiţionează între ele modificîndu-şi reciproc vitezele de excreţie. Astfel de medicamente sînt: sulfonamide, hipuraţi, salicilaţi, acetazolamidă, probenecid, fenilbutazonă, penicilină, benzotiazine etc. Acest fenomen este folosit pentru a inhiba excreţia unui medicament în scopul menţinerii unei concentraţii mari în sînge, cum ar fi efectul probenecidului şi carinamidei asupra secreţiei penicilinei.

În general metaboliţii liposolubili polari sînt mai puţin reabsorbiţi decît cei liposolubili nedisociaţi. Produşii conjugării sînt hidrosolubili, mult ionizaţi la *p*H-ul sîngelui şi cu o eliminare mai rapidă. De fapt, detoxifierea ca şi metabolizarea cresc hidrosolubilitatea şi de aceea compuşii acizi sau înalt polari nu sînt metabolizaţi.

Scanned with OKEN Scanner

1.4.2.2. Eliminarea medicamentelor pe cale digestivă

Eliminarea medicamentelor pe cale digestivă este folosită mai ales pentru substanțe insolubile, care nu se absorb în tubul digestiv (cărbune, ulei de parafină, săruri de bismut) sau solubile neabsorbabile ($MgSO_4$). Excreția prin bilă se produce mai ales pentru metaboliți înalt polari ca săruri biliare, glucuronizi și eliminați prin fecale. Datorită marii permeabilități a celulelor parenchimului hepatic, bariera dintre bilă și sînge permite trecerea unor molecule cu masă moleculară mai mică de 400. Conjugații excretați prin bilă pot fi hidrolizați sub acțiunea florei intestinale producînd uneori produși mai toxici, cum este cazul aminelor policiclice aromatice care dau prin hidroliză *o*-hidroxamine cancerigene. Secreția biliară este dependentă de asemenea de legarea de proteinele celulare hepatice, cum ar fi cazul unor coloranți ca bromosulfonftaleina [54]. Unele medicamente care se reabsorb participă astfel la un ciclu enterohepatic așa cum a fost demonstrat în cazul bilirubinei (cap. 2). Normal, medicamentul care se elimină pe calea biliară suferă o concentrare în vezica biliară. Prin contracția vezicii provocată sau în urma ingestiei de alimente, se va realiza în intestin o concentrație mare în medicamentul respectiv. La bolnavii cu obstrucție biliară se ajunge la o concentrare mare în plasmă, cu prelungirea semivieții medicamentului. Se cunosc și inhibiții competitive a unor medicamente, cum ar fi excreția biliară în cazul asocierii rifamicinei cu bromosulfonftaleina.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Albert, *Pharmacol. Rev.*, **4**, 136 (1952).
2. A. C. Allison, *Brit. Med. Bull.*, **24**, 135 (1968).
3. K. W. Anderson, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **147**, 171 (1964).
4. L. J. Anghileri, *Biochim. Biophys. Acta*, **136**, 386 (1967).
5. A. H. Anton, J. J. Boyce, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **42**, 809 (1964).
6. R. Ashton, L. K. Steinrauf, *J. Molec. Biol.*, **49**, 547 (1970).
7. K. J. Backer, *Proc. Soc. Biol. Med.*, **122**, 957 (1966).
8. B. E. Ballard, E. J. Nelson, *J. Pharm. Exp. Pharmacol.*, **135**, 170 (1962).
9. E. H. Barany, *Acta Physiol. Scand.*, **88**, 412 (1973).
10. R. R. Barghgraef, R. Pitts, *J. Clin. Invest.*, **35**, 31 (1956).

Scanned with OKEN Scanner

45. B. K. Martin, *Nature*, **207**, 274 (1965).
46. J. D. Mullins, T. J. Macek, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **49**, 245 (1960).
47. W. G. Nayler, *J. Pharm. Exp. Therap.*, **153**, 479 (1966).
48. E. J. Nelson, *J. Am. Pharm. Assoc.* **47**, 297 (1958).
49. E. J. Nelson, T. O'Reilly, *J. Pharm. Exp. Therap.*, **129**, 368 (1960).
50. E. J. Nelson, E. L. Knochel, J. G. Wagner, *J. Pharm. Sci.*, **51**, 509 (1962).
51. E. J. Nelson, *Clin. Pharmacol. Therap.*, **4**, 283 (1963).
52. L. W. Nichol, A. G. Ogston, D. J. Winzor, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **121**, 517 (1967).
53. G. B. Odell, *J. Pediat.*, **55**, 268 (1959).
54. B. G. Piresly, W. J. O'Reilly, *J. Pharm. Pharmacol.*, **18**, 41 (1966).
55. L. Pauling, *Science*, **134**, 15(1961).
56. M. H. Pindell, K. M. Cull, K. M. Doraw, *J. Pharm. Exp. Therap.*, **125**, (1959).
57. D. V. Parker, „The Biochemistry of Foreign Compounds", Pergamon Press, Oxford, 1968.
58. M. Ruthardt, A. Herrera, J. Rositer, J. Fabre, *Praxis*, **61**, 803 (1972).
59. J. E. Riseman, S. Horetsky, G. E. Altman, *Am. J. Cardiol.*, **15**, 220 (1965).
60. L. S. Schancker, *J. Pharm. Exp. Therap.*, **126**, 283 (1959).
61. L. S. Schancker, P. A. Shore, B. B. Brodie, C. A. Hogben, *J. Pharm. Exp. Therap.*, 120, 528 (1957).
62. L. S. Schancker, D. J. Tocco, B. B. Brodie, C. A. Hogben, *J. Pharm. Exp. Therap.*, 123, 81 (1958).
63. P. A. Shore, B. B. Brodie, C. A. Hogben, *J. Pharm. Exp. Therap.*, **119**, 361 (1957).
64. S. Schneierson, D. Amsterdam, *Nature*, **182**, 56 (1958).
65. P. Seeman, W. O. Kwant, *Biochim. Biophys. Acta*, **183**, 476 (1969).
66. P. Seeman, W. O. Kwant, T. Sanks, *Biochim. Biophys. Acta*, **183**, 499 (1969).
67. A. H. Seppala, *J. Bioenergetics*, **2**, 197 (1971).
68. J. A. Shanon, D. P. Earle, B. B. Brodie, *J. Pharm. Exp. Therap.*, **81**, 307 (1944).
69. H. M. Solomon, J. J. Schrojie, *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 1219 (1967).
70. R. Soremack, *Acta Physiol. Scand.*, **50**, 119 (1960).
71. H. Stein, *Analyt. Biochem.*, **13**, 305 (1965).
72. H. H. Using, *Advan. Enzymol.*, **13**, 21 (1952).
73. J. G. Wagner, *Drug. Intell.*, **2**, 181 (1968).
74. J. H. Weikel, P. M. Lish, *Arch. Intern. Pharmacodyn.*, **119**, 398 (1969).

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 2

METABOLIZAREA MEDICAMENTELOR

2.1. Generalități

În urma pătrunderii în organism, majoritatea medicamentelor suferă o serie de transformări care preced sau urmează acțiunii lor terapeutice. În multe cazuri, aceste transformări încep chiar în cursul absorbției (cap. 1), dar în general ele au loc în diferite organe, mai ales în ficat. Metabolizarea medicamentelor se datorește funcțiunii vitale a organismelor de a se apăra de compușii străini lui, pătrunși separat sau odată cu substanțele nutritive. De aceea, de multe ori se suprapun noțiunile de metabolizare a medicamentelor cu procesul de detoxifiere. Într-adevăr, mecanismele de detoxifiere (conjugare cu glutation redus, sau cu acid glucuronic) fac parte din metabolizarea medicamentelor, constituind o ultimă etapă. Atît produșii metabolizării cît și cei ai detoxifierii sînt excretați prin bilă și eliminați prin fecale sau duși în rinichi și îndepărtați pe cale urinară (cap. I).

De eficacitatea sistemelor metabolizante depinde acțiunea farmacologică sau eventual una toxică, ținînd seama și de influența unor factori menționați la sfîrșitul capitolului. În general, metabolizarea medicamentelor sau a altor compuși străini organismului cuprinde două faze. Prima fază este alcătuită din reacții de hidroxilare, de oxidoreducere, datorită cărora pe molecula inițială a medicamentului sînt grefate grupări adiționale OH, NH_2, COOH etc. De fapt faza întîia este pregătitoare, avînd ca scop labilizarea moleculei și creșterea caracterului ei polar. Produsele fazei întîi pot fi farmacologic active sau toxice, pe cînd cele rezultate în urma fazei a doua sînt de obicei inactive. Faza a doua constă în conjugarea produselor primei etape cu compuși naturali ca acid glucuronic și excreția lor prin fecale, urină, sudoare, aer expirat. Conjugarea medicamentelor duce la mascarea grupării funcționale introduse în

prima fază și duce la dezactivarea moleculei, la scăderea capacității farmacologice. Deci predominanța caracterului liposolubil ajută la pătrunderea prin membranele celulare, iar cel hidrosolubil favorizează metabolizarea unui medicament. Substanțe cu un coeficient mare lipide/apă vor trece ușor prin membrane, dar vor difuza înapoi din urina tubulară în celulele tubilor renali și de aici în plasmă; astfel de medicamente vor avea un *clearance* hepatic mic și o mare persistență în organism.

Prin metabolizarea unor medicamente în compuși mai polari se reduce reabsorbția tubulară. Mecanismele specifice secretorii din parenchimul hepatic sau din tubii renali proximali acționează numai asupra compușilor înalt polari. Oxidarea grupării metil la carboxil face un medicament mult mai excretabil pe cale renală sau biliară; astfel o singură modificare metabolică reduce semiviața biologică de la cîteva ore la cîteva minute. Conjugarea unui medicament cu anionul sulfat produce un efect similar.

Există unii compuși ca eter dietilic, acid ftalic, barbitonă care sînt excretați aproape complet nemodificați. Aceasta se produce cu substanțe înalt polare (acidul ftalic are $pK = 3{,}0$) și nu pot pătrunde în țesuturi sau cu compuși volatili care sînt excretați prin plămîni. În cazul barbitonei numai 5% din cantitatea inițială este metabolizată, restul trecînd integral în urină. Unele substanțe nepolare cum sînt hexaclorobenzen și insecticide clorurate nu sînt ușor metabolizabile și nici excretabile fiind depozitate în țesuturile grase din organism.

Adesea produșii metabolici derivați dintr-un medicament au activitate biologică mai mare decît substanța inițială. De exemplu, fenacetina (acetofenetidina), cît și acetanilida sînt analgesici slabi și antipiretici mult utilizați. S-a demonstrat de către Brodie și Axelrod [19] că ambii compuși sînt metabolizați într-un compus comun, mai polar, parahidroxiacetanilida (acetaminofen), antipiretic, analgesic, care este de fapt agentul activ, iar medicamentele inițiale sînt inerte. Metabolizarea ulterioară a acetoaminofenului (fig. 2.1) se face printr-o conjugare tipică, producînd esteri sulfați și glucuronați, compuși polari inerți. Ambele medicamente sînt metabolizabile într-o măsură mai mică prin acetilarea grupării amino, producînd derivați ai anilinei, transformabili ulterior în aminofenoli, fenilhidroxilamină. Acest exemplu ilustrează clar acțiunea far-

Scanned with OKEN Scanner

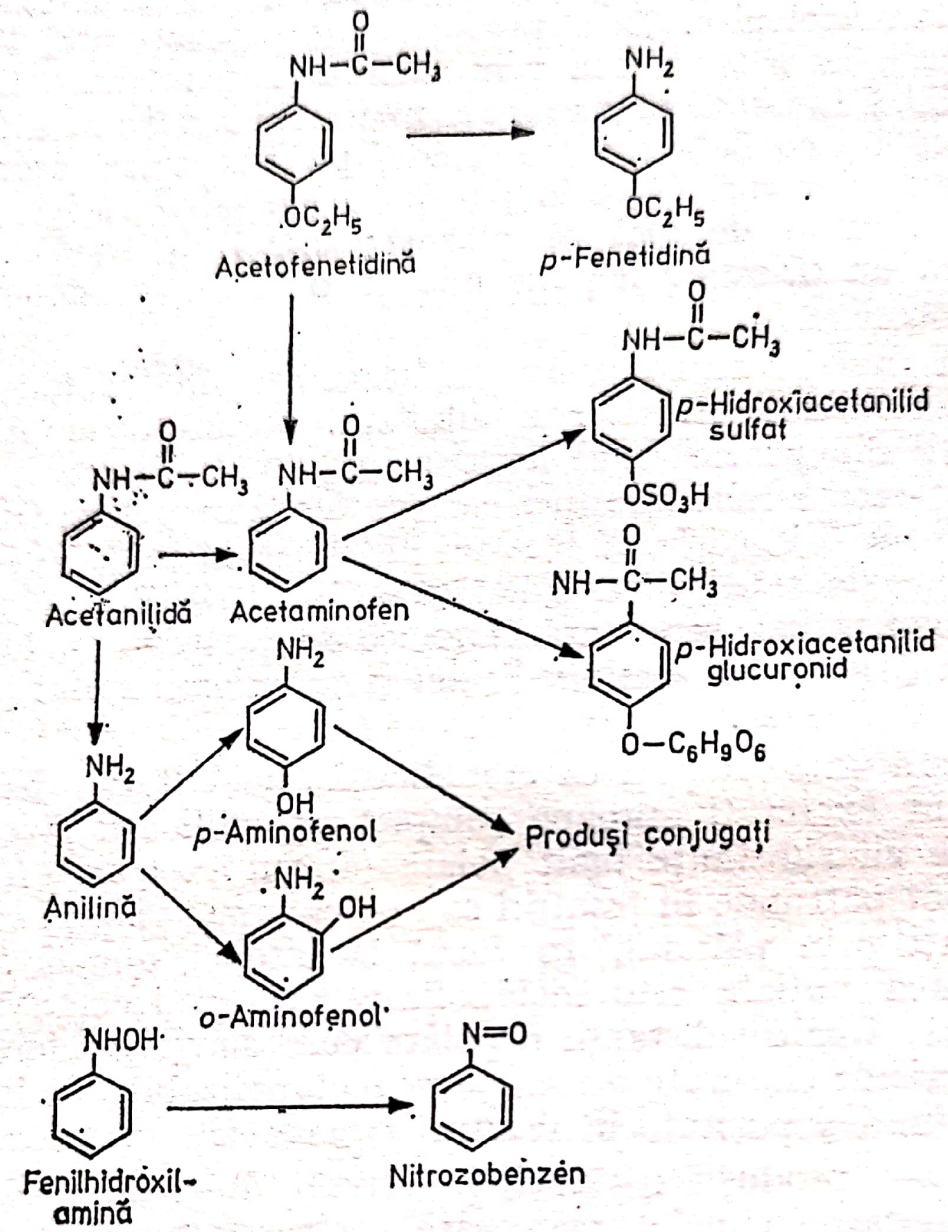


Fig. 2.1. Metabolizarea fenacetinei, după [19].

macologică a unui medicament, diferitele căi de metabolizare şi eventual un efect toxic. Astfel la doze mari de acetanilidă, creşte concentraţia derivaţilor anilinei care au un caracter methemoglobinizant. Scăderea solubilităţii în lipide a unui medicament nu înseamnă neapărat creşterea solubilităţii în apă. Astfel sulfatiazolul este metabolizat pe mai multe căi, unele producînd compuşi mai puţin solubili în apă decît substanţa iniţială; în consecinţă acest medicament a fost abandonat în favoarea altor sulfamide.

Alteori, datorită reversibilității reacțiilor biochimice, un medicament polar poate trece într-unul mai puțin polar. De exemplu, deacetilarea acetanilidei în anilină sau reducerea hidratului de cloral la tricloroetanol: $CCl_3\text{-}CH(OH)_2 + NADH + H^+ \rightarrow Cl_3C\text{-}CH_2OH + NAD^+ + H_2O$ [103].

Metabolizarea medicamentelor s-a dezvoltat în cursul evoluției viețuitoarelor, odată cu trecerea la viața terestră. Organismele marine nu posedă de obicei sistemele metabolizante, dar pot excreta compuși lipidosolubili direct în apă prin membrane.

Medicamentele moderne sînt molecule complexe, care sînt metabolizabile prin mai multe reacții, producînd adesea un număr mare de metaboliți, de exemplu clorpromazina dă mai mult de 20 cataboliți. Activitatea unui medicament este deci dependentă de viteza metabolizării și de ponderea relativă a diferitelor căi de metabolizare. O apreciere cantitativă a sorții metabolice a unui medicament este de mare ajutor pentru înțelegerea acțiunii activității farmacologice și a conduitei terapeutice. Deoarece un metabolit diferă în general de percursorul său printr-o singură grupare chimică, o cale metabolică constă dintr-o serie de compuși foarte strîns înrudiți chimic și deci foarte greu de identificat. Unele transformări cum sînt deschiderea unui ciclu sau dispariția unei grupări cromofore pot fi urmărite chiar în materialul brut, dar în general este nevoie de folosirea unor tehnici destul de laborioase de separare cum sînt extragerea în solvenți, distribuția în contracurent pe baza coeficienților de partiție, diverse tehnici cromatografice, electroforetice, trasori radioactivi etc. Soarta medicamentelor este studiată prin tehnici biochimice sau biologice pe animale normale sau organ ectomizate, perfuzii de organ. Tehnicile biochimice folosesc pentru determinarea unor cataboliți metode și aparatură complexă, modernă, ca spectrofotometre, fluorometre, cromatografe de gaz, rezonanță electronică de spin sau paramagnetică nucleară, scintilatoare.

Studiul metabolizării medicamentelor este necesar pentru siguranță, dar și pentru găsirea unor noi medicamente mai eficace. În plus, prescripția multiplă de medicamente, devenită o practică curentă, necesită cunoașterea metabolizării diferitelor substanțe administrate pentru obținerea unui efect terapeutic mai eficace sau pentru a evita interferențe metabolice nedorite ori cazuri cînd un medicament devine toxic.

Scanned with OKEN Scanner

2.2. Hidroxilarea medicamentelor

2.2.1. *Sistemul enzimatic microzomial*

Conform celor menționate în introducerea acestui capitol, adevărata metabolizare a medicamentelor are loc în special în microzomii hepatici prin labilizarea moleculei medicamentelor datorită introducerii unei grupări adiționale, mai ales hidroxil [20].

Se știe că reticulul endoplasmic din celulele hepatice sau al altor celule se prezintă microscopic ca o rețea tubulară de natură lipoproteică ce cuprinde întreaga citoplasmă. În general se disting două forme, una reticulară, aspră *(rough)*, legată de ribozomi, și alta tubulară, fără granule, netedă *(smooth)*, mai bogată în activitate enzimatică. Se pare că sinteza enzimelor se produce în forma reticulară, care apoi pierde microzomii implicați în sinteza proteică, devenind de tip neted [41, 126], ipoteză încă neverificată. Prin omogenizarea țesuturilor și deci spargerea celulelor, reticulul endoplasmic este fragmentat în particule mici, cunoscute ca microzomi. Fracțiunea microzomială se obține în mod curent prin centrifugare diferențială. În urma centrifugării timp de 60 minute la 105000 g se depozitează microzomii (celelalte fracțiuni fiind deja îndepărtate) iar deasupra se obține fracțiunea solubilă, supernatant celular sau citosol. Obținerea enzimelor din fracțiunea microzomială este dificilă din cauza asocierii lor puternice cu membranele lipoproteice ale reticulului endoplasmic. Deci microzomii sînt de fapt artefacte experimentale obținute *in vitro* prin ruperea structurilor membranare ale reticulului endoplasmic.

Lucrările lui Brodie și colaboratorii [20, 21] au atras atenția asupra transformărilor biochimice ale unor medicamente cu structuri variate, care au loc în microzomii celulelor hepatice. Cerința pentru oxigen molecular și pentru NADPH sugerează că acesta din urmă împreună cu O_2 formează un complex activ ce transferă oxigenul moleculei medicamentului. Din acest complex face parte un factor identificat ulterior ca citocromul P_{450} [50]. Numele acestui citocrom provine de la proprietatea lui ca în stare redusă să se combine cu oxidul de carbon dînd un maxim caracteristic la 450 nm.

Citocromul P_{450} constituie locul activității oxigenului, funcționînd ca o monooxigenază în oxidarea unor mari varietăți de substanțe ca steroizi, colesterol, acizi grași, medicamente, hidrocarburi policiclice etc. [55, 112]. Această hemoproteină

a fost găsită în microzomii și mitocondriile mai multor țesuturi, dar mai ales în ficat, într-o concentrație ceva mai mare de 0,1 milimol/gram țesut proaspăt [1]. Tratarea microzomilor cu diferiți reactivi sau medicamente *in vitro* produce o deplasare a maximului în spectru al complexului cu CO la 420 nm. Citocromul P_{420} este catalitic inactiv, rezultînd probabil dintr-o modificare conformațională a membranelor microzomiale. Molecula citocromului P_{450} izolată din diferite surse (mamifere, insecte, bacterii) are o masă moleculară în jur de 50000 [42], conține o grupare feriprotoporfirină IX cu doi liganzi aminoacizi, probabil cisteina și histidina [43, 89]. Metoda obișnuită de determinare bazată pe măsurarea deplasării spectrale în urma trecerii unui curent de CO [112], cît și alte studii au arătat existența mai multor tipuri de citocrom P_{450} [125].

Astfel, dacă diferite substraturi sînt adăugate unor suspensii de microzomi în prezența O_2, dar fără NADPH, pot fi înregistrate diferențe spectrale caracteristice (fig. 2.2). Tipul I, datorit hexobarbitalului, etilmorfinei, aminopirinei, deoxicorticosteronei prezintă un maxim la 385—390 nm și un minim la 419—425 nm. Tipul II, datorit anilinei, piridinei, nicotinamidei este caracterizat printr-un maxim la 426—435 nm și minim între 390—405 nm [34, 124, 135]. Majoritatea medicamentelor prezintă diferențe spectrale de tipul I, accelerînd reducerea P_{450} de către NADPH. Cu excepția O_2, compușii ce produc tipul II sînt substraturi slabe, mai degrabă inhibitori, micșorînd efectul reductor al NADPH [53]. În literatura de specialitate se găsesc descrise și alte tipuri de modificări spectrale ale citocromului P_{450} datorite unor insecticide [99, 120], metilcolantrenului și altor substanțe cancerigene [131, 136, 123].

Concentrația și activitatea citocromului P_{450} poate varia mult între specii, indivizi și la același individ, în funcție de vîrstă, influențe hormonale etc. Cu toate dificultățile existente datorită naturii sale particulare, citocromul P_{450} a fost purificat din diferite surse [81, 88] și studiat din punct de vedere al proprietăților fizico-chimice [64, 144], schemei probabile de reacție [63, 55], intermediarilor [72, 43], cineticii [9, 64].

Un alt component important al sistemului microzomial este NADPH-citocrom-*c*-reductaza, o flavoproteină avînd FAD (flavinadenin-dinucleotid) drept coenzimă și o masă moleculară între 57000—68000 [80, 140]. Au fost notate diferențe față de afinitatea pentru NADPH, citocrom *c* sau unii coloranți ca

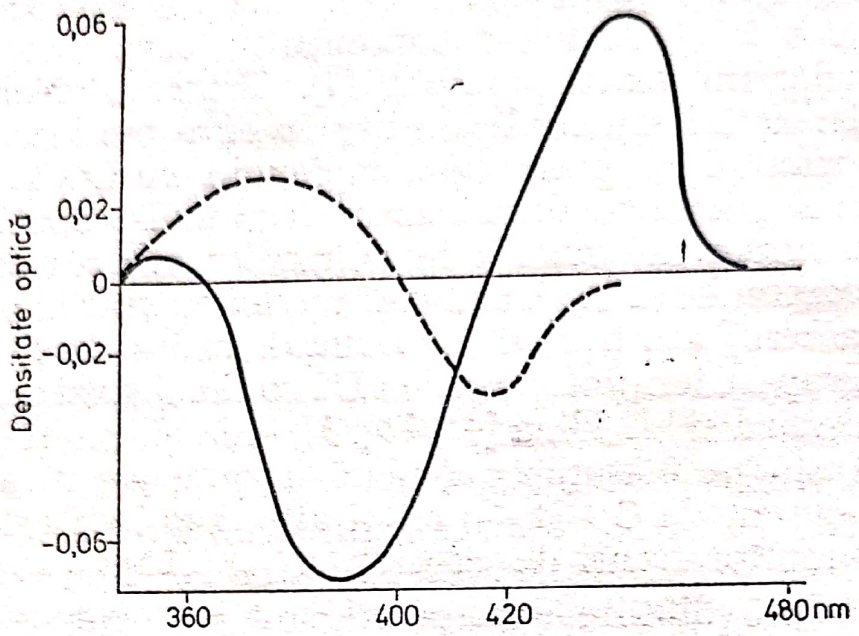


Fig. 2.2. Diferențe spectrale în urma adăugării unor substraturi suspensiilor de microzomi. Tip I (— — —) după hexobarbital și tipul II (———) după anilină [55].

diclorofenolindofenol, nitrobluetetrazoliu, în funcție de sursa de extracție [130, 157]. După Estabrook et al [43], concentrația acestei enzime este mai mică decît cea a citocromului P_{450}. Acest fapt nu este pe deplin acceptat, cu atît mai mult cu cît Masters și col. [97, 98] au demonstrat că în microzomii hepatici de la porc se găsesc două enzime NADPH dependente, una citocrom-*c*-reductază și alta cu activitate aminoxidazică (funcție mixtă). Funcția acestei enzime este reducerea citocromului P_{450} în microzomii ficatului, suprarenalei, splinei, rinichilor și altor țesuturi sau organisme inferioare.

Citocromul b_5 este un alt component al sistemului microzomial electronic descoperit de Strittmatter [141] și purificat [140]. La insecte s-a izolat citocromul *b*-555, cu o masă moleculară de 13700 și este considerat ca o formă solubilizată a citocromului b_5 [110, 158].

Sistemul de transport electronic din microzomi este de importanță primordială pentru prima fază de metabolizare a medicamentelor. Ca și în cazul altor sisteme de transport electronic, cum ar fi respirația din mitocondrii, acest sistem transferă electroni sau echivalenți reducători de-a lungul unui șir de transportori redox. Sistemul microzomial pornește de la NADPH și se sfîrșește cu citocromul P_{450}, acesta constituind

oxidaza terminală. De partea heminică a acestui citocrom se leagă oxigenul, fiind activat și astfel încorporat în substratul constituit de medicament [51, 111, 126]. Experiențe efectuate cu $^{18}O_2$ și $H_2{}^{18}O$ au demonstrat că oxigenul introdus în radicalul OH al medicamentului provine din oxigenul molecular [54]. Nu vom insista asupra dovezilor experimentale în favoarea participării componenților mai sus menționați la sistemul de transport microzomial, acestea fiind dealtfel amintite cu ocazia discutării inducției.

În linii mari secvența componenților acestui sistem se cunoaște și schema generală este prezentată în fig. 2.3 a. Astfel medicamentul sau un alt compus exogen sau endogen (R) formează un complex cu citocromul P_{450} în stare oxidată, care este apoi redus de electronii proveniți de la NADPH. Complexul substrat-citocrom P_{450} redus se combină cu oxigenul molecular, descompunîndu-se rapid în substrat hidroxilat, apă și citocrom. O flavoproteină, NADPH-citocrom-*c*-reductaza (Fp_1) este intermediarul major între NADPH și P_{450} [80] și există destule dovezi experimentale pentru existența unui alt component Fe_x între flavoproteină și P_{450} [154], deși alte lucrări sugerează o reducere directă a citocromului P_{450} de către NADPH citocrom reductaza [1, 153]. Controverse considerabile există cu privire la semnificația fiziologică în metabolismul medicamentelor al altei căi redox care transferă electronii de la NADH la citocromul b_5, avînd drept intermediar o altă flavoproteină, NADH-citocrom-b_5-reductază (Fp_2) [141]. Există dovezi experimentale în favoarea unui șunt (fig. 2.3 c) această ultimă cale furnizînd echivalenți reducători pentru P_{450} [153], deși această cale pare mai importantă pentru desaturarea oxidativă a acizilor grași sau în reducerea ascorbatului [67]. Totuși participarea citocromului b_5 este susținută datorită necesității unui flux continuu și destul de bogat în electroni [8]. În acest sens prezentăm în fig. 2.3 b, o schemă a participării citocromului b_5 la formarea complexului medicament-citocrom P_{450}, în care funcțiile acestuia se încadrează într-un ciclu al diferitelor sale transformări.

Recent s-au comunicat încercări de reconstituire a sistemului enzimatic microzomial. Aceste experimentări cuprind citocrom P_{450} și NADPH-citocrom-reductaza purificate și diferite fracțiuni lipidice, în special fosfatidilcolina extrase din microzomi hepatici. Pe aceste componente s-a testat hidroxi-

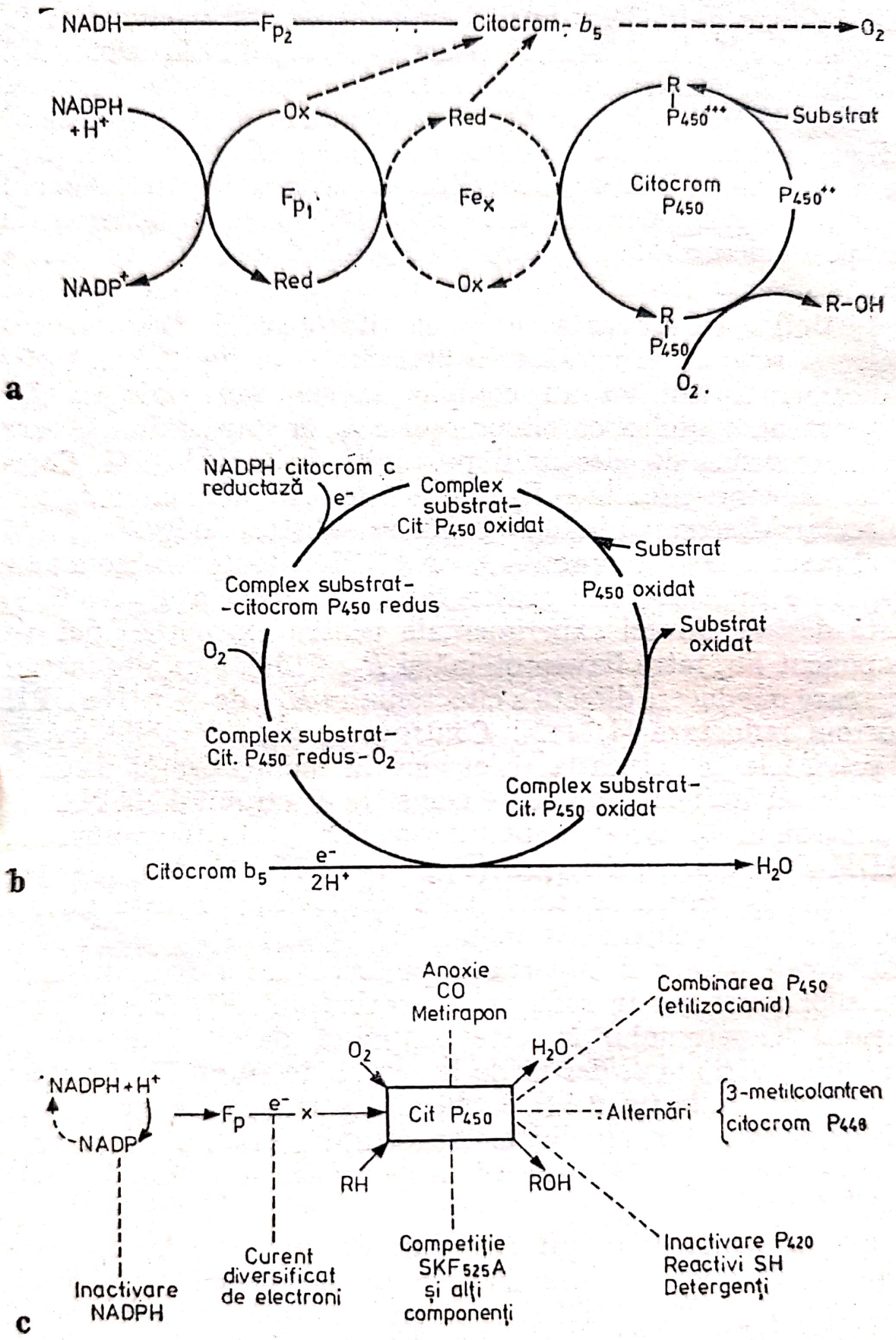


Fig. 2.3. Sistemul de transport electronic microzomial; a,b,c, diferite ipoteze asupra componenței (explicații în text)

larea unor compuşi aromatici [61, 91, 108]. Aceste experimente par să infirme participarea căii NADH — citocrom b_5, deşi fracţiunile lipoproteice nu sînt caracterizate. În schimb sînt întărite funcţiile componenţilor lipoproteici. În acest sens se poate face legătura cu un grup de lucrări axate pe mecanismul hidroxilării medicamentelor şi a altor compuşi care presupun formarea peroxizilor lipidici drept intermediari. Astfel, se ştie că acizii graşi superiori, nesaturaţi, ca cel linoleic, oleic, arachidonic constitue substratul cel mai favorabil formării peroxizilor lipidici. Asocierea producerii acestor peroxizi cu metabolizarea medicamentelor este previzibilă, datorită conţinutului bogat în acizi graşi nesaturaţi al membranelor. O serie de lucrări au şi arătat dealtfel că dintre toate fracţiunile subcelulare, microzomii şi apoi mitocondriile produc *in vitro* cantitatea cea mai mare de peroxizi [69, 156].

Pe de altă parte, încă din 1964, Orrenius et al. [115] au observat o interacţiune între peroxidarea lipidelor şi hidroxilarea unor medicamente, sugerînd o competiţie pentru NADPH. Lucrările recente au arătat că ultima secvenţă a sistemului microzomial, respectiv formarea complexului citocrom P_{450}-medicament-O_2 este mult mai complexă ca mecanism decît o indică schema din fig. 2.3 b. Pe de o parte s-au adus noi dovezi experimentale în favoarea peroxizilor lipidici în asociere cu metabolizarea medicamentelor din sistemul microzomial [70, 86, 87]. Pe de altă parte, s-a făcut o asociere cu lucrările lui Fridovich [46] asupra existenţei anionului superoxid O_2^-, ca treaptă intermediară în reacţiile redox, confirmată în foarte multe reacţii [56, 73]. În aceste lucrări, confirmate şi de alţi autori, s-a demonstrat existenţa în organism a unei superoxid dismutaze [37, 105], capabile să catalizeze descompunerea superoxidului printr-o reacţie de disproporţionare în oxigen şi peroxid de hidrogen:

$$2\,O_2^- + 2\,H^+ \rightleftharpoons H_2O_2 + O_2.$$

Această superoxid dismutază purificată, prezentă în majoritatea organelor, inhibă *(in vitro)* reacţii de hidroxilare sau de demetilare ale unor medicamente ca benzamfetamina [33], iar adăugarea unui sistem generator de superoxid (xantină + xantin oxidază) stimulează hidroxilarea unor medicamente de către sistemul enzimatic microzomial [33, 79]. Existenţa superoxidului ca treaptă intermediară nu exclude prezenţa peroxizilor, întărită dealtfel şi de ecuaţia de mai sus.

Scanned with OKEN Scanner

Reacțiile enzimatice de hidroxilare a medicamentelor sînt în general de forma: $RH + O_2 + XH_2 \rightarrow ROH + H_2O + X$, în care RH reprezintă substratul, iar XH_2 un donor de electroni, respectiv $NADPH_2$. Studiile stoichiometrice asupra demetilării unor medicamente [33, 55] sau oxidării antipirinei [55] indică utilizarea a 2 molecule de NADPH, un transfer de 2 electroni, cu scindarea legăturii O—O a oxigenului molecular, astfel că un atom este grefat substratului și altul este redus la apă Mecanismele detaliate ale acestei reacții în care este implicat întregul sistem de transport microzomial nu se cunosc. Oricum, labilizarea substratului și scindarea O_2 presupun transferuri de energie care necesită existența unor intermediari reactivi, cum ar fi peroxizii sau superoxidul. Legătura dintre acești intermediari pare sa fie prin intermediul glutationului redus, stimulent al sistemului xantin—xantin-oxidază (generator de superoxid) [56], iar pe de altă parte compus endogen cheie în reglarea formării și reglării producerii de peroxizi [27, 114]. Demonstrarea existenței acestor intermediari foarte reactivi implică de asemenea necesitatea prezenței și a unor sisteme de protecție de reglare, formate din superoxid dismutază pe de o parte și de glutation—glutation-peroxidază pe de altă parte. Abuzul de medicamente sau utilizarea unor toxice hepatice care generează peroxizi (tetraclorură de carbon) [138] oferă condiții pentru depășirea acestor sisteme protectoare și instalarea unei toxicități.

Ca și în alte domenii ale cercetării biochimice, folosirea unor inhibitori oferă posibilități noi de informație. Conform schemei prezentate în fig. 2.3c, se cunosc o varietate de compuși care inhibă hidroxilarea medicamentelor în microzomii hepatici. Acești compuși acționează fie la nivelul NADPH (distrugere enzimatică prin NAD-ază, pirofosfatază), ori direct asupra citocromului P_{450}, de exemplu SKF 525 A (dietilaminoetil difenilvalerat). Această substanță are un efect complex, acționînd *in vitro* și *in vivo*, micșorînd permeabilitatea celulară și circulația sanguină în ficat [6]. Alți inhibitori de acelaș tip sînt 1,3-benzodioxaliariloxialchilamine (din care face parte SKF 525), 1,2,3-benzotiadiazoli, aril-2-propinil eteri [23]. Deoarece acești compuși acționează sinergic cu multe insecticide, au fost amplu studiați din acest punct de vedere.

Oxidul de carbon și metapiron inhibă hidroxilarea medicamentelor în mod competitiv prin combinare cu centrul II

al citocromului P_{450}, prevenind astfel legarea substratului de centrul I. Detergenții acționează prin distrugerea membranelor microzomiale, iar reactivii grupării sulfhidril produc inhibiții reversibile, probabil prin producerea unor modificări conformaționale ale citocromului sau a altor proteine.

Nicotinamida, deși inhibă nucleotidaza (distrugînd NADPH), este necesară în concentrații mici (0,4 mM) și inhibă la nivele mai mari (119).

2.2.2. *Inducția enzimatică*

Dacă se adaugă fenobarbital sau hidrocarburi policiclice (în majoritate cancerigene) unui mediu conținînd omogenat de ficat nu se observă creșterea activității enzimelor microzomiale. Numai *in vivo*, prin injectarea acestor substanțe, se observă după cîteva zile o netă stimulare [29]. Astăzi se cunosc peste 200 compuși capabili să inducă, să crească activitatea enzimelor microzomiale din ficat [26, 30]. Efectul inductor nu poate fi explicat printr-o modificare a afinității enzimei pentru substrat. Deoarece această stimulare este oprită de inhibitori cunoscuți ai sintezei proteice (puromicina) s-a admis că inducția reprezintă o sinteză „*de novo*" a enzimelor microzomiale. Actinomicina D, care inhibă sinteza ARN mesager, impiedică de asemenea inducția enzimatică. După administrarea fenobarbitalului, actinomicina D blochează sinteza NADPH-citocrom-*c*-reductazei și a citocromului P_{450} [52]. Tratamentul cu 3-metilcolantren crește semnificativ cantitatea de ARN mesager și încorporarea aminoacizilor în microzomi [18]. Inducția pare deci să reprezinte o adaptare biochimică temporară, permițînd organismului să supraviețuiască expunerii hazardate a unor compuși chimici exogeni, cuprinzînd medicamente, insecticide și alte substanțe cu caracter liofilic [116].

Stimularea activității enzimelor microzomiale prin inducere este întovărășită de creșterea greutății ficatului, proliferarea reticulului endoplasmic neted [49], mărirea conținutului de fosfolipide, citocrom microzomial [124, 127].

Pretratarea animalelor de experiență cu un inductor va crește viteza metabolizării unui număr mare de medicamente, concomitent cu mărirea activității NADPH-citocrom-*c*-reductazei, citocromului *c*, a sintezei hemului și fosfolipidelor [41],

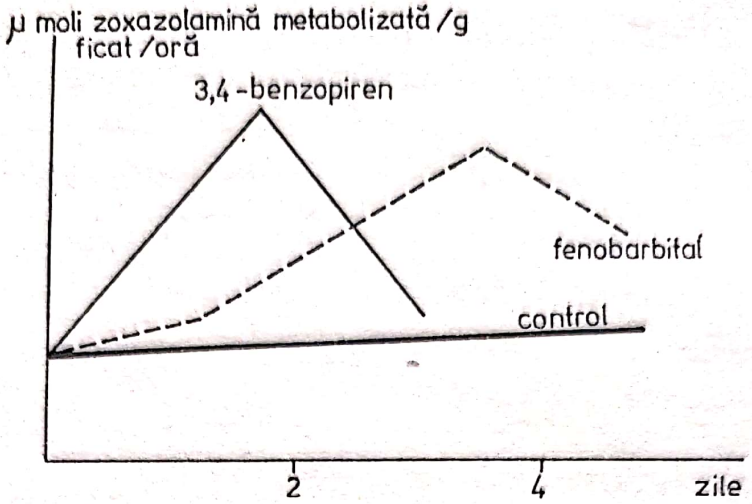


Fig. 2.4. Diferența în timp în inducția metabolizării zoxazolaminei după 3,4-benzopiren și fenobarbital [30]

cît și a schimbărilor spectrale de tip I și II menționate anterior Nu există legături în acțiunile farmacologice, inductive sau structurale între agenții inductori, și după Rommer [126], caracteristic acestor compuși pare să fie o mare solubilitate în lipide, o concentrare mare în ficat și o durată mare de acțiune.

Cu toate diferențele observate, totuși s-a observat în general o grupare a inductorilor în două tipuri; unii ca fenobarbitalul stimulînd mai multe feluri de reacții, alții ca 3-metilcolantrenul avînd o acțiune mai limitată. În timp ce *N*-demetilaza-3-metil-4-metilaminoazobenzen (MMAB) este stimulată de ambele tipuri de inductori, *N*-demetilarea etilmorfinei nu este crescută decît de fenobarbital. Sladek și Mannering [132] comparînd efectul inductiv al celor două grupe au ajuns la concluzia că un singur sistem enzimatic este responsabil de *N*-demetilarea etilmorfinei și a MMAB. Fenobarbitalul stimulează activitatea acestui sistem, dar 3-metilcolantrenul pare să acționeze prin mecanism separat și numai asupra MMAB-*N*-demetilazei. (fig. 2.4).

Lucrările ulterioare au stabilit cu certitudine că prin administrarea hidrocarburilor policiclice se induce un citocrom cu maxim la 448 nm, numit P_1-450 sau *P*-448 [3, 78], ori P-450$_k$ în microzomii celulelor renale [62], din intestinul subțire sau plămîni. Trebue subliniat că nu s-a găsit vreo corelație între efectele inductiv și carcinogenic al hidrocarburilor policiclice [32]. Inducția prin metilcolantren și compuși înrudiți modifică doar tipul de legătură II, cel de tip I pare absent. În acest sens trebue

menționat că prin tratarea microzomilor cu steapsină se pierde centrul de legătură I, iar cel de tip II nu este afectat. În consecință, centrul de legătură I pare mai fragil și nu este exclus ca inducția prin hidrocarburi policiclice să producă o formă aberantă de citocrom *P*, cu proprietăți spectrale diferite datorită acțiunii asupra lipoproteinelor din membrane [92, 135, 160]. Oricum, în inducția enzimatică, conformaționarea proteinelor, structura membranelor microzomiale joacă un mare rol cunoscut din cercetările întreprinse asupra sintezei proteice. Astfel Vainio [146] a observat abolirea efectului inductiv în urma acțiunii solubilizante a unor agenți chaotropici ca uree, sulfocianuri, KI, KNO_3 în concentrații mari (3—4 M) și de stimulare la nivele mai mici.

Legat de rolul microstructurii asupra efectului inductiv este și acțiunea celor doi inductori tipici. Recent Alvarez et al. [4] a găsit că în primele 12 ore după administrarea fenobarbitalului crește rapid activitatea *N*-demetilazei și conținutul în citocrom P_{450} numai în reticulul endoplasmic aspru, pe cînd pentru același interval de timp 3-metilcolantrenul produce efectul inductiv în ambele componente. După cum am amintit, există dovezi experimentale în favoarea sintezei în reticulul aspru și apoi în cel neted [111]. În acest caz nu se poate explica sinteza rapidă a citocromului P_{450} în ambele fracțiuni. S-ar părea că inductorul produce pe lîngă inducerea unei sinteze proteice „*de novo*" și un efect asupra microstructurii membranelor, modificînd conformaționarea proteinelor. În acest sens Gram et al. [58] a observat că în urma administrării de 3-metilcolantren se produc modificări în viteza de sedimentare a microzomilor și a separării celor două forme ale reticulului.

Obținerea unor concluzii clare, cantitative, este îngreuiată și de variatele condiții experimentale și a unor factori cum ar fi concentrația optimă de inductor. Nespecificitatea inducției enzimatice este întărită și de lipsa unei corelații clare între dozele administrate, durata necesară și apariția inducției. Pentru unele substanțe, dozele necesare producerii efectului inductiv pot fi mai mari, pentru altele mai mici, decît concentrațiile neeficace terapeutice. Pentru unele medicamente este suficientă o singură administrare, dar pentru majoritatea sînt necesare administrări repetate, cu durată variabilă. Cu rezervă se poate menționa că cu cît dozele sînt mai mari și repetate, efectul inductiv este mai mare. Astfel fenobarbitalul se adminis-

Scanned with OKEN Scanner

trează zilnic timp de trei-cinci zile în doze de 70—100 mg/kg, meprobramatul 150—200 mg, clorpromazina 15 mg. Se testează de obicei animale mature, masculi, ca de exemplu șobolani în greutate de 200 g. Activitatea enzimelor microzomiale și a sistemului de transport electronic crește chiar din prima zi, atingînd un maxim după cîteva zile. Durata inducției variază cu natura medicamentului în limite mari, de la cîteva zile pentru glutetimidă, pînă la cîteva luni pentru unele barbiturice [121], deși unele aspecte ale inducției (creșterea greutății ficatului) apar la doze mici, cum ar fi 4 mg/kg fenobarbital [118].

Desigur, este dificil de a prezenta lista completă a medicamentelor ce produc inducția, așa că vom menționa grupele și cîteva reprezentante:

TABELUL I

Grupe de medicamente ce produc inducția enzimatică

Hipnotice și *sedative*	*Anticonvulsive*
barbiturice, glutetimidă, uretan, clorbutanal, hidrat de cloral, etanol, talidomidă, paraldehidă, etinamat, metilprilonă	mefenitoidonă, parametadionă
Narcotice	*Miorelaxante*
protoxid de azot, eter etilic, cloroform, hidroxidonă	carizopradiol, mefenazină, zoxazolamină
Analgezice	*Tranchilizante, neuroleptice*
meperidină, morfină, metadonă, amidopirină	meprobramat, hidroxizină, clordiazoepoxid, clorpromazină promazină, trifluorpromazină
Antiinflamatoare	*Excitante ale sist. nervos central*
fenil și oxifenilbutazonă	niacetamidă, amfetamine, pentetrazol, imipramină, iproniazid
Hormoni	*Antihistaminice*
testosteron, cortizon, ACTH progesteron, estradiol, tiroxină	clorciclizină, difenhidramină
Hipoglicemiante	*Diuretice*
tolbutamidă, carbutamidă	clorotiazid
Anticoagulante	*Uricozurice*
dicumarol și compuși înrudiți	probenecid sulfanilamide cloramfenicol

Din această listă au fost omise substanțele colorante (anilină), cancerigene, insecticide, despre care se va aminti la partea dedicată influenței factorilor de mediu.

Principala importanță practică a fenomenului de inducție enzimatică rezidă în faptul că administrarea cronică a unui medicament sau toxic crește nivelul enzimelor implicate în metabolizarea proprie, iar datorită nespecificității marcate, administrarea unui medicament induce o metabolizare crescută față de altă substanță. Cum tratamentele moderne implică folosirea unei largi game de medicamente, interacția metabolizării lor datorită fenomenului de inducție influențează mult atît eficacitatea tratamentului, cît și posibilitatea unor accidente. Prezentăm mai jos o listă, desigur incompletă, a acestor interacțiuni datorită inducției.

TABELUL II

Interacțiuni clinice între diferite medicamente

Primul medicament	*Al doilea medicament*	*Bibliografie*
Fenobarbital	Anticoagulante cumarinice	[30, 47, 133]
Hidrat de cloral, griseofulvină, fenilbutazonă, feniramidol	„	
	„	
	„	
Trifluorpromazină	Meprobramat	[82]
Fenobarbital	Fenilbutazonă	[30]
Fenobarbital	Difenilhidantoină, griseofulvină	[36]
Fenobarbital	Hormoni steroizi	[32, 31]
Fenilbutazonă	„	
Tranchilizante	„	

Rezultatul practic al fenomenului de inducție este deci o metabolizare mai rapidă a unei largi game de medicamente provocate de administrarea cronică a unui medicament sau compus exogen. În cazul administrării de fenobarbital, substanță inclusă în multe medicamente complexe, se va reduce efectul anticoagulant al cumarinicelor. Prin întreruperea administrării fenobarbitalului, metabolizarea anticoagulantului revine la normal și deci trebue corectată doza pentru a evita accidente hemoragice.

Scanned with OKEN Scanner

Substanțe cu efecte teratogene, ca thalidomida, pot acționa și pe calea inducerii enzimatice. În urma administrărilor repetate s-a observat o reducere a efectului teratogen, mai ales după 15 zile de la fecundare, cînd fătul are o perioadă de sensibilitate maximă.

Inducția enzimatică poate fi provocată și de o serie de solvenți ca dimetilsulfoxid (folosit ca vehicul pentru medicamente insolubile) sau cloroform, eter, utilizați în industrie. Nicotina mărește activitatea enzimelor care metabolizează o serie de medicamente și chiar metabolismul nicotinei este mai intens la fumători decît la nefumători probabil datorită efectului inductor al hidrocarburilor policiclice din țigară. Dealtfel s-a și demonstrat prezența benzpiren-hidroxilazei în placenta femeilor care fumează, enzimă absentă la nefumătoare [77].

Datorită inducției enzimatice o serie de medicamente menționate sînt mai rapid metabolizate și dacă ele acționează sub formă nemetabolizată trebuesc crescute nivelele dozelor optime eficace. Aspectul opus poate indica o nouă cale terapeutică și anume prin posibilitatea măririi metabolizării unor compuși endogeni prin medicamente inductive. Astfel, metabolizarea bilirubinei poate fi crescută prin tratament cu fenobarbital. Hiperbilirubinemia nou-născuților datorită unui nivel scăzut de glucuronil-transferază a putut fi corectată prin fenobarbital, reducînd incidența icterelor neonatale, a necesității exsanguinotransfuziei [143].

Acțiunea inductoare a medicamentelor se menține și în cazul animalelor hipofizectomizate, castrate, tiroidectomizate sau suprarenalectomizate, așa încît controlul hormonal nu pare a fi predominant [7].

Studii recente au arătat că hormonii steroizi sau alți compuși endogeni ca bilirubina sînt substraturi pentru enzimele microzomiale implicate în metabolizarea medicamentelor și că stimulatorii și inhibitorii acestui sistem enzimatic pot altera metabolizarea constituenților normali [30, 32]. Astfel, animalele fetale sau nou-născute, spre deosebire de om, nu au capacitatea de a hidroxila o varietate de medicamente, dar o pot dobîndi în urma tratării animalelor pregnante cu diverși inductori ca medicamente, hidrocarburi policiclice, insecticide [32]. Microzomii din ficatul uman pot hidroxila la mijlocul gestației

Scanned with OKEN Scanner

Δ^4-androsten-3-17-diona sau testosterona în pozițiile 1β, 2α sau β, 6β, 16α, 18α [90]. Ficatul neonatal sau fetal conține activitate 16α-hidroxilazică pentru estradiol, estronă sau pregnenolon, absentă în ficatul de la maturi [129]. Conney [32] a observat recent stimularea hidroxilării hormonilor steroizi la animale și om după inducere cu insecticide ca DDT, fenobarbital, fenilbutazonă. Dealtfel, inducția enzimatică acționează și asupra biosintezei colesterolului [31], sau micșorează eficacitatea glucocorticoizilor [22].

După cum am menționat, inducția enzimatică presupune sinteza „*de novo*" printre altele și a citocromului P_{450}. În consecință, inducția este strîns legată de sinteza hemului, fapt demonstrat prin creșterea paralelă a activității δ-acid aminolevulinic-sintetazei, enzimă limitantă [95]. Scăderea inducției enzimatice la animalele în inaniție ar putea fi explicată prin lipsa aportului de hemină [11]. Griseofulvina, sedormidul, fenobarbitalul, clorochinul produc o inducție nespecifică a enzimei menționate, stimulează biosinteza porfirinelor, cu efecte dramatice la pacienții cu porfirie congenitală sau fotosensibilizare, dermatite în alte cazuri [59].

Inducția enzimatică a fost demonstrată la mamifere, batracieni, reptile, insecte. La microorganisme, inducția enzimatică este un factor de reglare, deosebindu-se prin latența instalării și prin durată. Producerea penicilinazei și altor enzime ce degradează antibioticele sau rezistența insectelor la insecticide arată posibilitatea transmiterii ereditare. În cazul mamiferelor s-au observat mari deosebiri de specie și în cadrul aceleiași specii între diferite organe. Inducția enzimatică predomină clar în ficat însă a fost evidențiată și în rinichi, plămîni, intestin, piele. Inducția enzimatică prin medicamente presupune modificări morfologice și sinteza crescută a unor enzime metabolizante și a componenților sistemului de transport electronic microzomial [107]. Cînd tratamentul cu medicamentul inductor este întrerupt, în funcție de natura acestuia se constată o regresie lentă a sintezei proteinelor enzimatice și revenirea la nivelul inițial. Aceste fapte pledează pentru modificări la nivelul genelor operatoare și a transcripției ARN mesager, menționate deja, dar care nu exclud și alte schimbări biochimice încă puțin cercetate.

Scanned with OKEN Scanner

2.2.3. *Reacții de oxidoreducere microzomiale*

După cum s-a amintit, metabolizarea medicamentelor începe cu o primă fază în care predomină reacții de oxidoreducere cuplate cu sistemul de transport electronic microzomial. Aceste reacții, destul de variate, au în comun ca trăsătură fundamentală introducerea oxigenului în molecula medicamentului. După experimentele devenite clasice ale lui Mason [96] și Hayaishi [68], enzimele ce catalizează încorporarea oxigenului în substraturi organice pot fi împărțite în trei categorii:

a) *dioxigenaze*, care încorporează ambii atomi de oxigen în substrat:

$$O_2 + \text{Substrat} \xrightarrow{\text{dioxigenaze}} \text{Substrat-}O_2$$

b) *monooxigenaze*, care încorporează un atom de oxigen în substrat și reduce celălalt atom de oxigen la apă cu ajutorul unui donor de hidrogen:

$$O_2 + \text{Substrat} + \text{Donor-}H_2 \xrightarrow{\text{monooxigenaze}} \text{Substrat-OH} + H_2O + \text{Donor}$$

c) *oxidaze*, care reduc O_2, fie la H_2O_2, sau la două molecule de apă, fără încorporarea O_2 în substrat (directă):

$$O_2 + 2H^+(4H^+) + 2e^-(4e^-) \xrightarrow{\text{oxidaze}} H_2O_2\ (2H_2O).$$

În metabolizarea medicamentelor predomină mai ales monooxigenaze, multe din ele fiind inductibile. Reacțiile redox implicate în metabolizarea medicamentelor și a compușilor exogeni în general vor fi prezentate schematic, grupate pe funcțiile principale transformate.

2.2.3.1. Dezalchilări

O largă varietate de medicamente și compuși exogeni sînt transformați metabolic în organism prin îndepărtarea grupării *O*, *N* și *S*-alkil, dînd fenolii, aminele sau tiolii corespunzători, conform reacțiilor generale:

$$\text{R-OCH}_3 \rightarrow \text{R-OCH}_2\text{OH} \rightarrow \text{R-OH} + \text{HCHO}$$
$$\text{R-NHCH}_3 \rightarrow \text{R-NHCH}_2\text{OH} \rightarrow \text{R-NH}_2 + \text{HCHO}$$
$$\text{R-SCH}_3 \rightarrow \text{R-SCH}_2\text{OH} \rightarrow \text{R-SH} + \text{HCHO},$$

Scanned with OKEN Scanner

cu variații în funcție de natura substraturilor. Eterii aromatici suferă *O*-dezalchilări formînd fenolii corespunzători și formaldehidă sau aldehidă acetică. Exemple de *O*-dezalchilări sînt furnizate de fenacetină (fig. 2.1), (acetofenetidină) codeină, în care legătura eterică este scindată [128].

N-dezalchilarea, mai răspîndită, se produce asupra aminelor secundare și terțiare formînd amine primare, ca de exemplu alchilaniline, *N*-dimetil-carbamați, nitrozoamine alifatice, *N*-metilbarbiturați, catecolamine, aminopirine, morfină și alte medicamente (fig. 2.5 a). Mecanismul intim al reacțiilor nu se cunoaște încă și într-un timp se credea în existența unor *N*-oxizi sau *N*-hidroxialchil derivați ca intermediari. Ulterior, ipoteza formării unui derivat carbinolamină pare să se verifice experimental [20, 71].

Carbinolaminele sînt în general compuși foarte instabili, practic imposibil de izolat și au formula generală $\begin{matrix}R_1\\R_2\end{matrix}\!>\!NCHOH\text{-}R_3$.

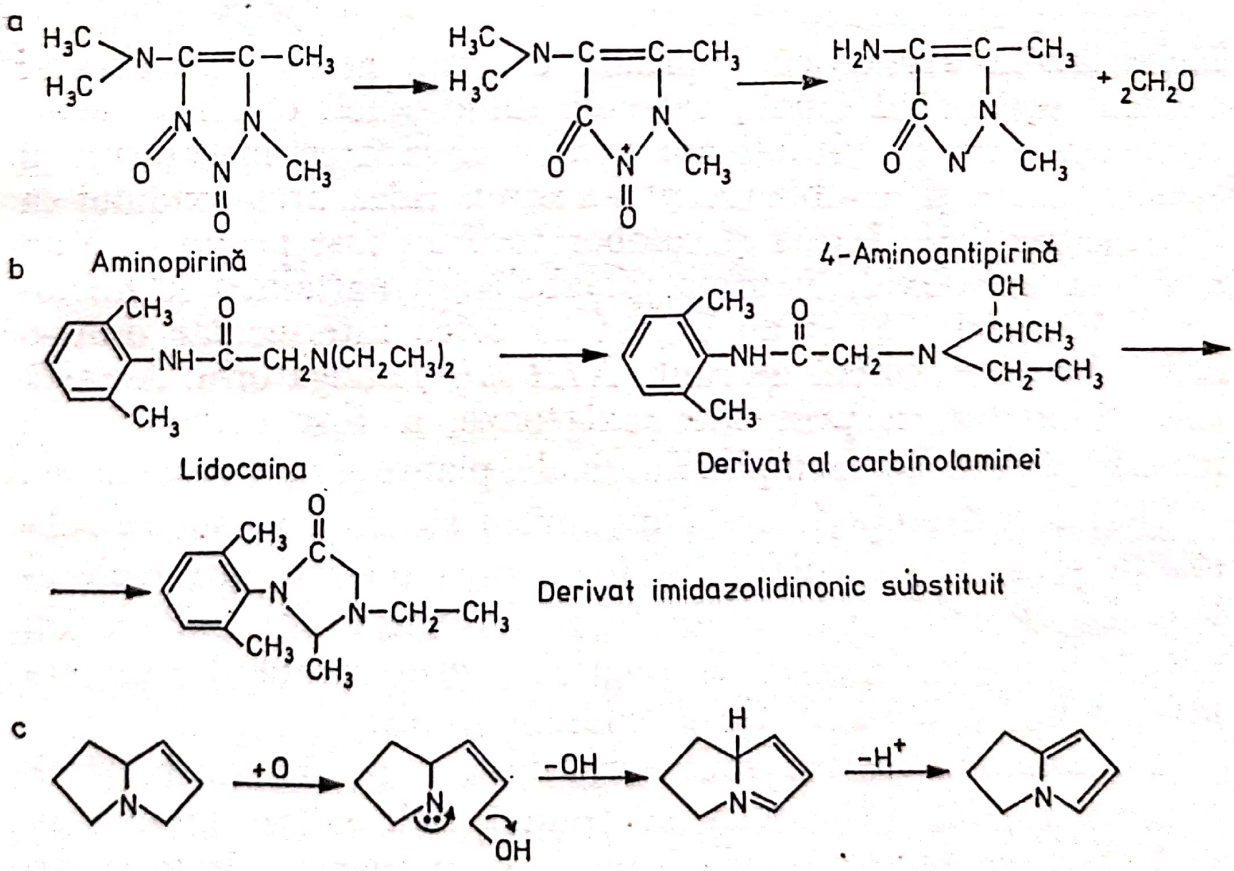


Fig. 2.5. Dezalchilări (exemple) (explicații în text).

Breck și Trager [17] au arătat că metabolitul urinar al anestezicului local lidocaina la om este o imidazolidinonă substituită (fig. 2.5 b). Ei au propus existența unui intermediar carbinolamină rezultat prin condensarea intramoleculară prin gruparea amidică nucleofilă. Derivații carbinolaminici se pot condensa cu grupări nucleofile (sulfhidril, histidinil) constituind o cale mai generală pentru *N*-dezalchilare. Mecanisme similare au fost propuse pentru unii agenți anticonvulsivi [2], ca hexametilfosforamida, un antispermatogenic [76], tremorina [26], prolitan, agent analeptic, ciclofosfamidă, metilpiron [71]. Importanța cunoașterii naturii intermediarului constă mai ales în posibilitatea conjugării lui, a orientării efectului terapeutic spre unul toxic. Hepatotoxicitatea alcaloizilor avînd ca bază nucleul pirolizidinic (fig. 2.5 c) poate fi explicată prin formarea unor intermediari carbinolaminici, acționînd ca alkilanți [101].

2.2.3.2. Hidroxilarea aromatică

Hidroxilarea aromatică cuprinde o largă gamă de compuși exogeni producînd fenoli, catecoli, dihidrodioli etc. S-a depus un mare efort în ultimii ani pentru elucidarea mecanismului acestei reacții și de-abia recent s-a admis calea aren-oxidului ca intermediar [74]. Jerina și colaboratorii au fost primii care au izolat un aren-oxid, în urma metabolizării naftalinei în microzomii hepatici [75] și au arătat că orice intermediar dintr-o aril hidroxilare suferă un șunt *(NIH shift)* obligatoriu. Această cale, hidroxilarea prin monooxigenaze, a fost exemplificată în peste o sută de exemple la animale, plante și microorganisme.

Jerina a descoperit acest mecanism studiind pe multe substanțe și pe intermediarii lor metabolici migrări intramoleculare cu retenții concomitente a substituenților arilici. Un exemplu simplu de astfel de migrare a grupării metil este prezentată în fig. 2.6 a, în cazul oxidului *m*-xilen.

Mecanismul acestui șunt este ilustrat în fig. 2.6 b. Dacă aren-oxizii sînt obligatorii în timpul hidroxilării aromatice, ei trebue să prezinte acest șunt ilustrat printr-o izomerizare preferată la fenoli, forme cetotautomere. Migrarea izotopului

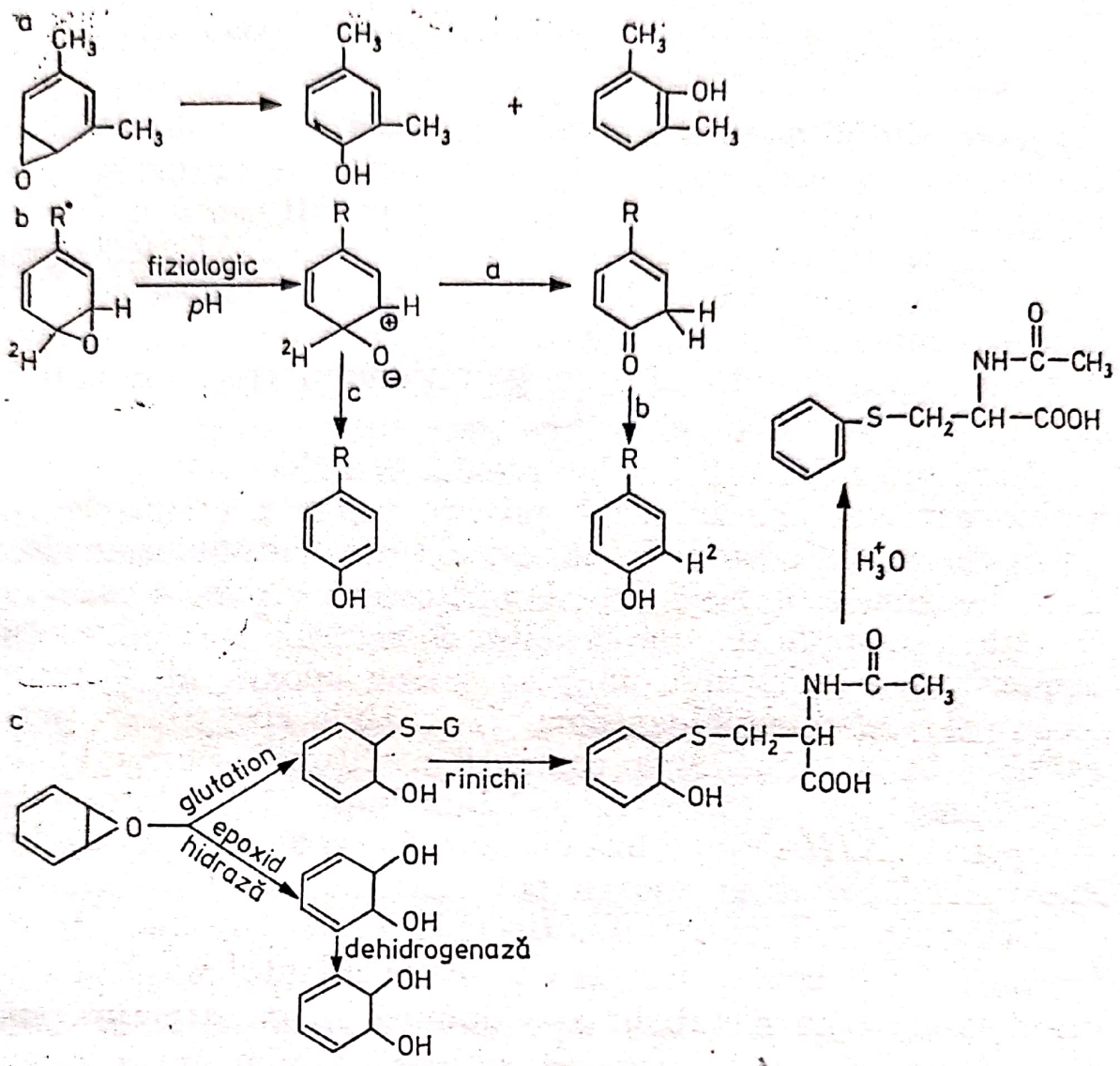


Fig. 2.6. Mecanismul migrării intramoleculare în reacții de hidroxilare; a,b,c, diferite exemple cu explicații în text.

are loc în etapa *a*, iar calea *b* predomină. Verificarea experimentală a fost efectuată cu benzenoxid incubat cu microzomi hepatici, obținîndu-se prin izomerizare fenol, fig. 2.6 c. Enzima epoxid hidraza catalizează producerea trans-1,2-dihidroxi-1, 2-dihidrobenzen. Prin adăugarea glutationului (G) și a fracțiunii solubile din omogenat, din benzenoxid s-au mai identificat încă doi produși, un conjugat al glutationului, precursor al acidului fenil mercapturic și catecol, rezultat prin dehidrogenarea dihidrodiolului [150]. În animalul intact, acidul fenil-mercapturic se transformă în rinichi în derivat *N*-acetilat. Mecanismul prezentat [fig. 2.6 c] a fost verificat cantitativ, cu ajutorul izotopilor radioactivi și astfel postulatul aren-oxizilor ca interme-

diari emisă de Boyland [13] devine un mecanism general în metabolismul aromatic.

Odată admisă ipoteza existenței aren-oxizilor ca intermediari în hidroxilarea aromatică, o serie de incidente dramatice prin folosirea acestor compuși au putut fi explicate, cum ar fi toxicitatea și necroza tisulară [21], carcinogenitatea [57], mutagenitatea [5]. Aceste efecte sînt cauzate prin adiția nucleofilă și legarea covalentă rezultantă a biopolimerilor cu aren-oxizi. Acțiunea epoxid hidrazei și a glutationului redus servesc la protejarea structurilor celulare.

Toxicitatea hidrocarburilor aromatice halogenate, cum ar fi bromobenzenul, este crescută prin pretratarea animalelor cu fenobarbital, în schimb inhibitori ai metabolismului medicamentelor cum este SKF-525 A micșorează efectul toxic [10]. O altă exemplificare importantă a acestui mecanism este demonstrarea existenței unui precursor epoxid al agentului terapeutic 5,5-difenilhidantoina [24]. Unii epoxizi ar putea exista și în metabolizarea compușilor naturali, cum este demonstrarea prezenței squalen-2,3-oxidului [159] iar șuntul menționat *(NIH shift)* a fost observat în cazul 3-deutero-3-deoxiestronei [106]. Unii epoxizi pot constitui agenții reali terapeutici, cum ar fi compusul antineoplazic, maytansina [84], sau inactivi. La șobolanii tratați cu anticoagulantul warfarină s-a izolat în ficat un metabolit al vitaminei K_1 cu structură epoxidică. Autorii [100] sugerează acțiunea inhibitoare a warfarinei asupra transformării epoxidului în vitamina K. Existența epoxidului vitaminei K_3 (menadionei) a fost observată indirect prin acțiunea asupra catalazei și ar putea explica efectul methemoglobinizant al acestei substanțe [113].

Orientarea hidroxilării în compușii aromatici nu este totdeauna previzibilă. Astfel la compușii aromatici *N*-heterociclici, ca piridina, hidroxilarea are loc în poziția 3, iar dacă mai este atașat un ciclu benzenic, hidroxilarea apare în pozițiile *o* și *p* față de atomul de azot, de exemplu chinolina produce 3-, 6- și 8-hidroxichinolină. Orientarea hidroxilării depinde de natura substituenților, astfel compușii fenolici dau ca produși finali catecoli și chinoli, iar derivații anilinei produc *o*- și *p*-aminofenoli. Sulfanilamida este hidroxilată la gruparea amino N_4, producînd *p*-hidroxilaminobenzensulfonamidă [145]. Derivații

hidroxilaminei dau *o*-aminofenoli, compuşi mai toxici decît substanţele iniţiale. *N*-hidroxilarea pare a fi o cale minoră, comparativ cu hidroxilările compuşilor exogeni ce se produc la atomii de O, C sau P, şi catalizată de enzime diferite [12].

2.2.3.3. Oxidări

Oxidări ale diferitelor medicamente pot avea loc la atomii de N sau S. Derivaţii olefinici sînt metabolizaţi în dihidrodiolii corespunzători, avînd după toate probabilităţile epoxizi drept intermediari. Aceşti compuşi au fost evidenţiaţi în cazul aldrinului (metabolitul este toxic), stirenului, ciclohexenului [109]. Foreman şi Maynert [47] au găsit că secobarbitalul este transformat în tetrahidrofuropirimidină.

N-oxidarea unor compuşi aromatici produce derivaţi aminoxizi, care mai pot apărea şi în urma altor căi metabolice, ca *N*-demetilarea. Clorpromazina este metabolizată prin multe căi metabolice dînd peste douăzeci de metaboliţi, printre care *N*-oxid şi sulfoxid (fig. 2.7 a).

Thioridazina, medicament din grupa fenotiazinelor, produce prin metabolizare 2- şi 5-sulfoxizi, cît şi un disulfoxid (fig. 2.7 b), care în continuare se va transforma într-o disulfonă. Aceste două tipuri de fenotiazine exemplificate mai sus sugerează atît mecanisme comune de metabolizare (oxidare la atomul de sulf), dar şi diferenţieri, atît ale substanţelor iniţiale (posibilităţi de *S*-oxidare), cît şi la metaboliţii lor [134]. Hidroxilarea hexobarbitalului ce conţine un ciclu ciclohexenic produce 3-hidroxihexobarbital în microzomii hepatici, care este oxidat ulterior în forma 3-ceto, de către enzime localizate în supernatantul celular (fig. 2.7 c). Dealtfel Gillette [55] a observat mai de mult că şi în cazul pentobarbitalului sau în alte oxidări alifatice în care apar alcooli sau forme hidroxilate, se produce ulterior o oxidare la aldehide, cetone sau acizi carboxilici, catalizate de alcool-dehidrogenază sau aldehid-dehidrogenază. Fenilbutazona, medicament antireumatic antipiretic, analgezic, determină retenţia sodiului şi blochează reabsorbţia renală tubulară a acidului uric. Prin descoperirea că analogii 4-feniltioetilbutazonă sînt metabolizaţi cu formare de sulfoxizi, s-a obţinut prin sinteză sulfinpirazona, un uricosuric foarte eficace.

Scanned with OKEN Scanner

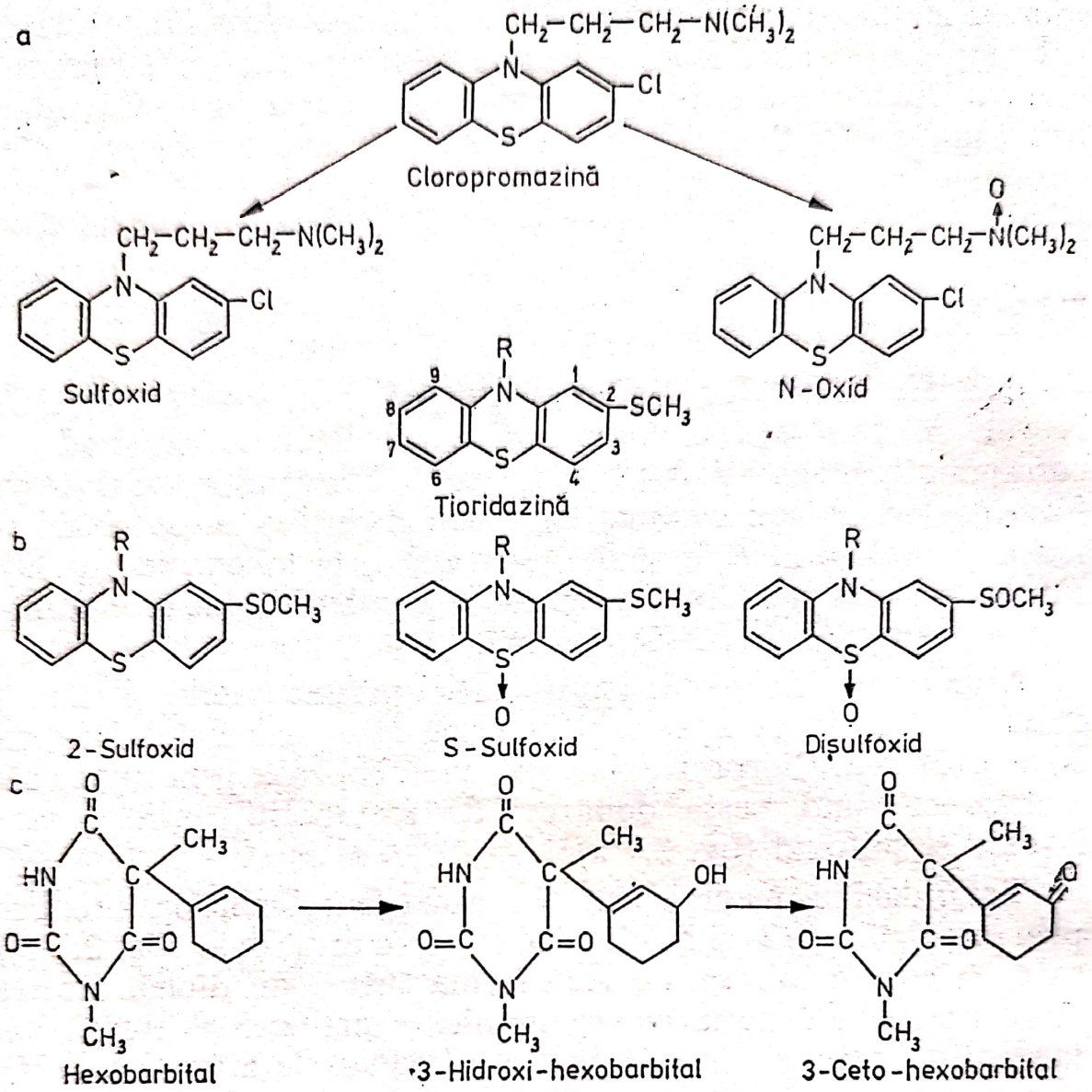


Fig. 2.7. Oxidări ale unor medicamente (exemplificări cu produşi finali); a. clorpromazina, b. tioridazina, c. hexobarbital

2.2.3.4. Dezaminarea oxidativă

Dezaminarea oxidativă poate avea loc şi în microzomi, conform reacţiei:

$$R-\underset{\underset{NH_2}{|}}{CH}-CH_3 \longrightarrow R-\overset{\overset{OH}{|}}{\underset{\underset{NH_2}{|}}{C}}-CH_3 \longrightarrow R-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH_3 + NH_3.$$

În afara cunoscutei monoamin-oxidaze, mai există în microzomi o amin-oxidază, care dezaminează amfetamine şi alte amine [104].

2.2.3.5. Desulfurarea

Desulfurarea constă în înlocuirea atomului de sulf cu oxigen.

Un număr apreciabil de medicamente ca tiobarbituraţii (fig. 2.8), insecticidele fosforotionate, derivaţi ai feniltioureei şi *N*-ariltioureei sînt metabolizaţi pe această cale. Eliberarea concomitentă de sulfuri probabil este cauza toxicităţii acestor compuşi.

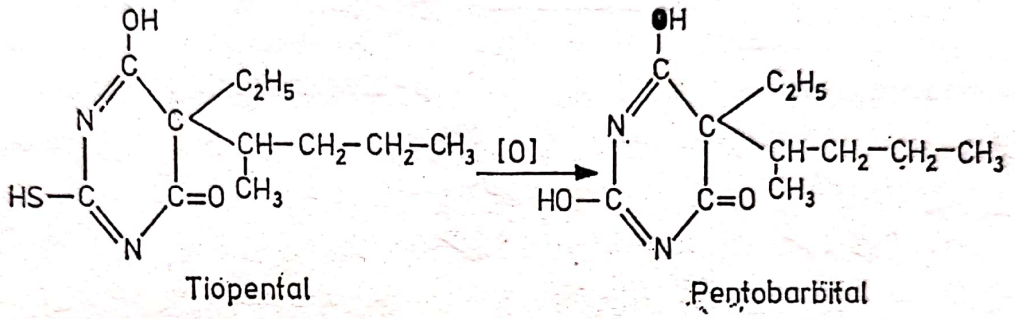


Fig. 2.8. Transformarea tiopentanului în pentobarbital (formă fenol).

2.2.3.6. Reducere prin enzime microzomiale

Reticulul endoplasmic conţine sisteme enzimatice cuplate sistemului electronic de transport care pot reduce o largă gamă de compuşi străini organismului cum sînt derivaţii nitro- şi azo- aromatici la aminele corespunzătoare. Sistemele enzimatice sînt formate în special de flavoenzime avînd FAD drept coenzimă. Cuplarea se face probabil printr-un sistem de reacţii, ca de exemplu:

$$NADPH_2 + FAD^+ \xrightarrow[\text{reductaza}]{\text{citocrom } c} FADH_2 + NADP^+$$

$$3FADH_2 + R\text{-}NO_2 \xrightarrow{\text{neenzimatic}} 3FAD^+ + R\text{-}NH_2 + 2H_2O.$$

Nitroreductazele prezente în microzomi şi citosol produc reducerea cloramfenicolului, acidului *p*-nitrobenzoic, nitrobenzenului.

Reducerea compuşilor azo- se face mai întîi la derivaţi hidrazo, urmată apoi de o sciziune reductivă în două molecule

de amine aromatice, așa cum reiese în cazul *p*-dimetilaminoazobenzenului (fig. 2.9 a).

Feller et al. [45] au arătat că un derivat hidroxilaminat este metabolitul principal al niridazolului (1-(5-nitro-2-tiazolil) -2 -imidazolidinonă) un agent antischistosomal (fig. 2.9 b). După toate probabilitățile, acest intermediar este factorul activ, dar și legat de toxicitatea ridicată.

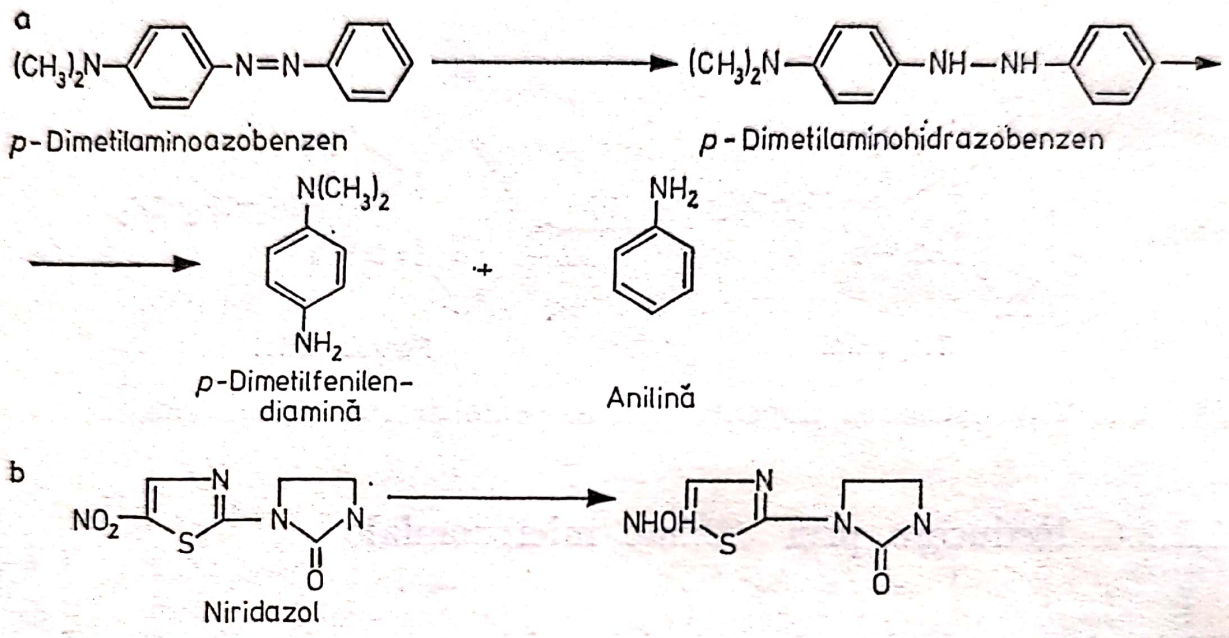


Fig. 2.9. Reduceri microzomiale ale unor compuși; a. *p*-dimetilaminoazobenzen; *b*. niridazol

Asemănător, McCalla și colaboratorii [102] au observat că distrugerile tisulare la șobolani tratați cu nitrofurazonă este legată de viteza metabolizării acestui compus la derivați puternic legați de proteine. Din nou s-a postulat existența probabilă a unor derivați hidroxilaminici intermediari.

Brodie [19, 20] are meritul de a fi descoperit sistemul microzomial de metabolizare al medicamentelor, dar și de a sugera importanța caracterului liofilic. Mc Mahon [104] și Hantsch [66] au confirmat această ipoteză, observînd relații cantitative între coeficientul de partiție al medicamentelor și viteza lor de metabolizare. Caracteristicile electronice și sterice ale unui medicament pare că intervin în orientarea reacțiilor de hidroxilare, în alegerea căii metabolice de transformare.

Scanned with OKEN Scanner

Metabolizarea medicamentelor de către sistemele enzimatice microzomiale prezintă două trăsături: mai întîi medicamentul trebue să pătrundă și să se combine cu enzimele absorbite pe microstructuri și în al doilea rînd metabolizarea este urmată de desorbția produselor de reacție. Structura intervine în orientarea și modificarea vitezelor de reacție. În acest sens Hantsch [66] a observat pe un număr mare de medicamente cu structură foarte diferită că prin urmărirea vitezei dispariției NADPH (reacție comună hidroxilărilor) există o foarte mică variație a valorii V_{max} (viteză maximă). În schimb, valoarea constantei lui Michalis, K_m, (indicînd afinitatea sistemului) variază de 1000 ori. Aceasta sugerează că cel mai important factor este de fapt legarea medicamentului de enzimă. Nu s-a găsit o relație cantitativă decît între valoarea K_m și coeficientul de partiție octanol/apă al medicamentului în formă neutră (P) sub forma ecuației: $\log 1/K_m = 0{,}69(\pm 0{,}19) \log P + 2{,}90(\pm 0{,}38)$.

Din studiile lui Hantsch rezultă că formele ionizate ale medicamentelor sînt puțin atacate de sistemele enzimatice microzomiale. Așa cum s-a arătat în cap. 1, există mari diferențe în coeficienții de partiție între formele neutre și ionizate ale unor compuși. Tot Hantsch [66] a extins aceste corelații și la alte tipuri de reacții microzomiale cum ar fi transformarea citocromului P_{450} în P_{420} datorită unor medicamente sau asupra demetilării și hidroxilării. În toate aceste tipuri de reacții microzomiale s-a observat o dependență semnificativă față de caracterul hidrofobic al substraturilor. Pentru o serie de medicamente, s-au găsit următoarele relații:

log formei metabolizate % $= 0{,}63 \log P + 0{,}60$, sau pentru durata (T), în ore, $\log T = -0{,}63(\pm 0{,}18) \log P + 0{,}79(\pm 0{,}35)$. Cu cît medicamentul este mai lipofilic este mai repede absorbit și metabolizat iar durata lui de acțiune este mai scurtă. Scăderea solubilității în lipide a unui medicament în urma metabolizării microzomiale nu înseamnă neapărat creșterea solubilității în apă. Sulfonamidele pot fi metabolizate pe mai multe căi, unele producînd compuși mai puțin liposolubili, dar și mai puțin hidrosolubili, cum ar fi sulfatiazolul, ce trece în acetilsulfatiazol. Din această cauză respectiva sulfonamidă a fost abandonată în favoarea altor derivați mai solubili.

Scanned with OKEN Scanner

2.3. Metabolizarea medicamentelor de sisteme nemicrozomiale

Paralel cu oxidările catalizate de enzime microzomiale, medicamentele și alți compuși străini organismului suferă o serie de transformări chimice sub influența unor enzime situate în mitocondrii, citosol etc. Astfel în mitocondrii se găsesc amino-oxidaze care convertesc aminele în aldehide sau enzime sau care aromatizează derivații ciclohexanului. În fracțiunea solubilă se găsesc alcool-dehidrogenaza, aldehid-oxidaza, xantin-oxidaza, care oxidează alcooli și aldehide. Amin-oxidaza și esteraze se găsesc și în plasmă, iar flora intestinală contribue destul de mult la unele transformări metabolice.

2.3.1. *Oxidări nemicrozomiale*

Oxidări nemicrozomiale au loc în special în mitocondrii ș citosol, fiind catalizate de mono- și diamin-oxidaze. Produșii de reacție sînt aldehide aril sau alchil, ce sînt oxidate mai departe de alte enzime la acizii corespunzători. De fapt, reacțiile sînt dezaminări oxidative după reacția:

$$R-CH_2-NH_2 \xrightarrow{O_2} R-CH=NH \longrightarrow R-CHO + NH_3.$$

Monoamin-oxidaza acționează în special în centrii de formare și stocare a catecolaminelor pe care le dezaminează în *o*-metil derivați. În schimb nu atacă amine cu grupare fenilizopropilamină (amfetamine, efedrină) care rămîn netransformate sau sînt metabolizate în microzomi.

Diamin-oxidaza dezaminează oxidativ histamina, cadaverina, putresceina. În timp ce diamine cu număr mai mare de 9 atomi de carbon sînt dezaminate de monoamin-oxidază, cele cu un număr mai mic sînt transformate de diamin-oxidază. În plasmă se găsesc benzilamin-oxidaze și spermin-oxidază. Aminele secundare și terțiare sînt mai rezistente la dezaminare oxidativă și suferă dezalchilări preferențiale, producînd amine primare.

O largă varietate de alcooli primari sînt oxidați în aldehide și cetone sub acțiunea alcool-dehidrogenazei localizată în fracțiunea solubilă din ficat, rinichi, plasmă cu ajutorul NAD sau NADP.

Metabolizarea alcoolului etilic este mai complexă, existînd și o cale catalizată de catalază [55]. S-a demonstrat și reacția

inversă de reducere a aldehidelor și cetonelor la alcoolii respectivi, în funcție de echilibrul sistemului și de NADPH-ul disponibil:

$$\underset{\text{hidrat de cloral}}{CCl_3CH(OH)_2} + NADPH_2 \xrightleftharpoons{\text{alcool-dehidrogenază}} \underset{\text{tricloroetanol}}{CCl_3CH_2OH} + NADP^+ + H_2O$$

Aldehidele aromatice și alifatice sînt oxidate în acizii carboxilici corespunzători și supuși β-oxidării. Enzimele ce catalizează această oxidare, aldehid-oxidaza, xantin-oxidaza se găsesc în fracțiunea citosolică a ficatului.

2.3.2. *Reduceri*

Se cunosc un număr de reduceri metabolice nemicrozomiale cuprinzînd sisteme destul de puțin cunoscute atît ca natura enzimelor implicate, cît și ca localizarea lor. Astfel de reduceri cuprind dubla legătură (mai ales pentru terpene monociclice nesaturate ca β-felandren), disulfuri (reducerea Antabuse sau disulfiram la acid dietilditiocarbamat) sulfoxizi (dimetilsulfoxid în dimetilsulfură [38].

Mai cunoscute sînt azo- și nitroreducerile, din care unele sînt din domeniul istoric. Astfel prontozilul, colorant azo, care a fost folosit pentru tratamentul infecțiilor cu streptococi și pneumococi, se metabolizează în sulfanilamidă (*p*-aminobenzensulfonamida), factorul activ (fig. 2.10a)

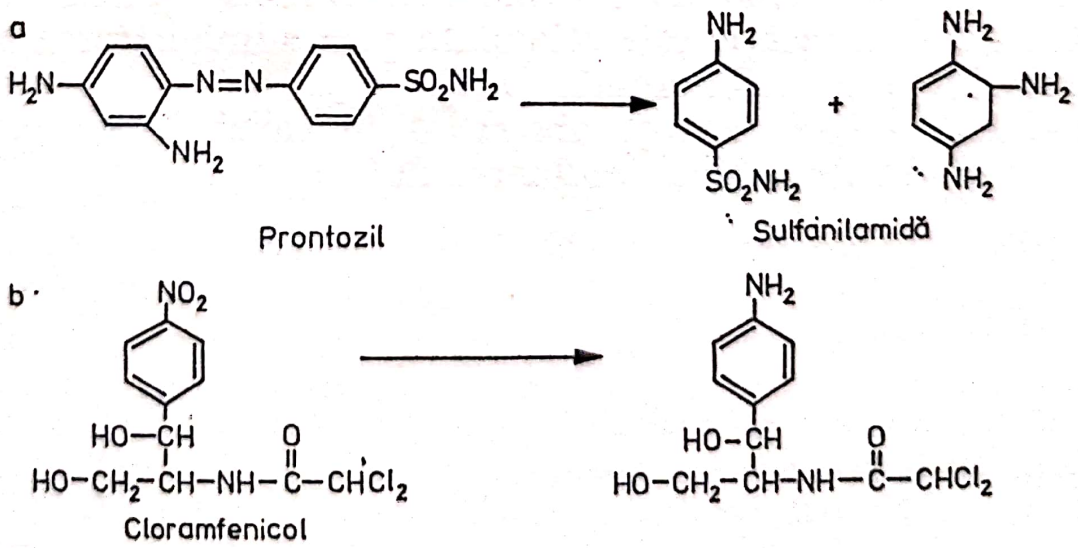


Fig. 2.10. Exemple de reduceri nemicrozomiale; a. prontozil, b. cloramfenicol.

Cloramfenicolul, agent antibacterian, este redus la amina corespunzătoare (fig. 2.10b). Sistemele nitro- și azo-reductazice, deși par diferite, au în comun implicarea și a unor reacții anaerobe, cu NADPH, sau stimulare prin flavine [123].

2.3.3. *Dehidroxilarea aromatică*

Dehidroxilarea aromatică se observă mai ales la compușii catecol-substituiți în poziția 4 cu producere de *m*- și *p*-monofenoli.

Eliminarea crescută a acizilor *m*-hidroxiaromatici a fost observată după administrarea DOPA, flavonoizi, acid cafeic (acid 3, 4-dihidroxicinamic).

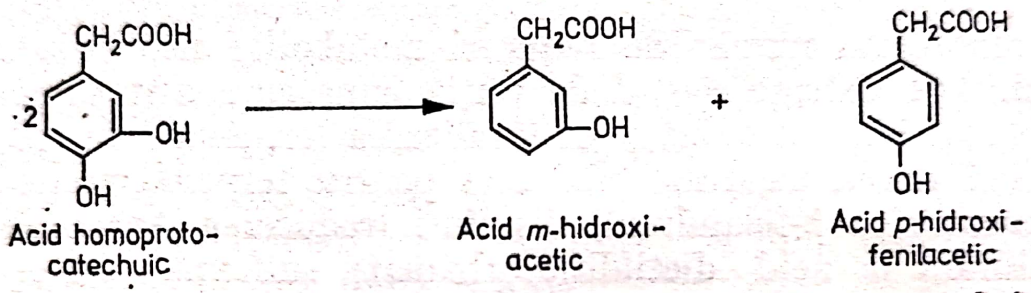


Fig. 2.11. Dehidroxilarea aromatică a acidului homoprotocatechuic

Dehidroxilarea aromatică poate fi și rezultatul acțiunii florei intestinale, fiind inhibată prin administrarea de antibiotice [107].

Dehidroxilarea alifatică se întîlnește în metabolismul noradrenalinei, producînd acid *m*-hidroxifenilacetic și acid homovanilic. Această reacție este stimulată prin administrarea hipoglicemicului oral, tolbutamida [123].

N-dehidroxilarea a fost observată în cazul *N*-hidroxiuretanului, *N*-hidroxiacetilaminofluorenului.

2.3.4. *Hidroliza*

Hidroliza esterilor și amidelor proveniți din compuși exogeni are loc sub acțiunea unor enzime hidrolitice localizate în plasmă și în ficat. Esterii de tip R-COOR′ trec în acizi (R-COOH) și alcooli (R-OH) sub acțiunea esterazelor de tipul acetilcolinesterază, pseudocolin-esterază, alil-esterază cu distribuție în

funcţie de specie. De exemplu, numai la iepure atropina este metabolizată în acid benzoic, ecgonină. Procaina este hidrolizată în acid *p*-aminobenzoic şi dietilaminoetanol (fig. 2.12) de către esteraze plasmatice, dar procainamida şi alte amide sînt mai stabile.

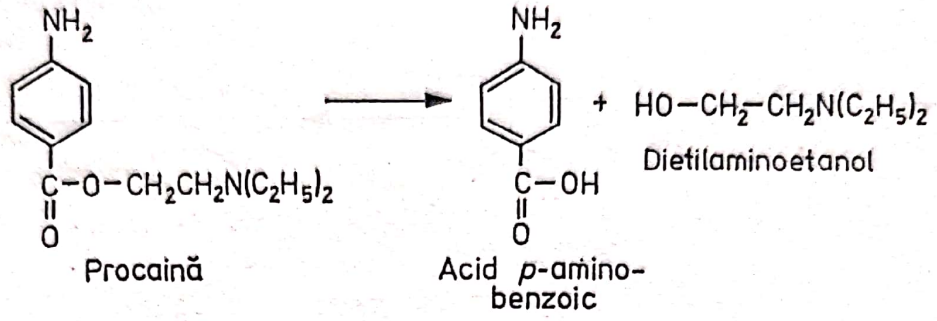


Fig. 2.12. Hidroliza procainei

Aspirina, acidul acetilsalicilic, este uşor metabolizată după 2 ore de la administrare, prin hidroliză în diferite ţesuturi.

Hidrazidele acizilor aromatici sînt de asemenea hidrolizate; hidrazida acidului izonicotinic (izoniazid) este hidrolizată în întregime la cîine, dar la om această cale are o importanţă minoră.

Carbamaţii ($R—OOC—NH_2$) sînt hidrolizaţi *in vivo* într-un alcool şi un acid carbamic care se descompune ulterior în uree.

2.3.5. *Scindări de ciclu*

Scindări de cicluri hidrolitice se produc destul de des, mai ales la heterocicli. Dilantinul (5,5-difenilhidantoina), un medicament antiepileptic, sau alte medicamente pe bază de hidantoine ca mesantoina (5-etil-3-metil-5-fenilhidantoina), nirvanolul (5-etil-5-fenilhidantoina) sînt metabolizate prin deschideri de ciclu (fig. 2.13 a) [123].

Medicamente avînd nucleu benzenic sau indolic pot suferi deschideri de ciclu oxidative. Interesant de amintit că în timp ce la om, cîine, iepure s-au observat formări variabile de acid *trans, trans*-muconic, la bacterii de tip *Pseudomonas* această reacţie duce la formarea izomerului *cis, cis*. Cumarina este metabolizată prin hidroxilare, urmată apoi de scindare oxidativă în acid *o*-hidroxifenilacetic [123].

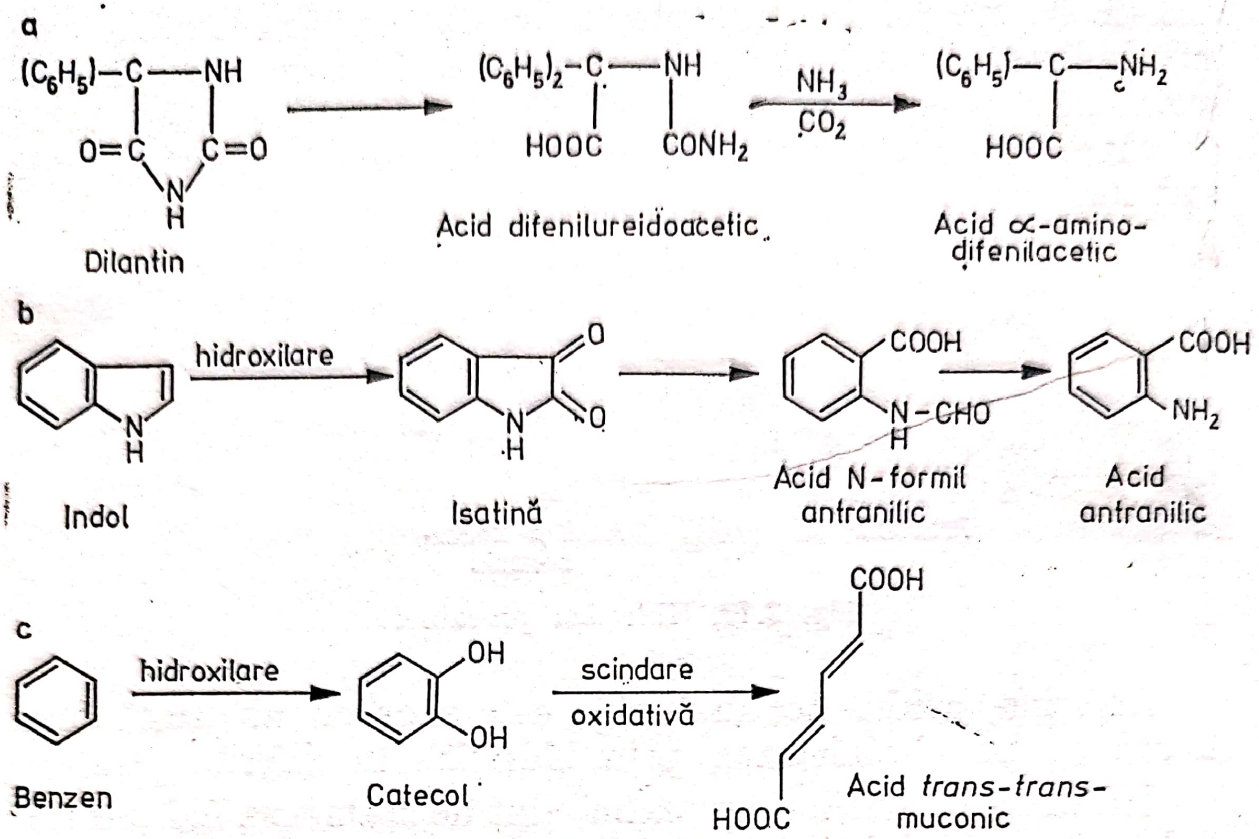


Fig. 2.13. Metabolizări prin deschideri de ciclu (exemplificări); a. dilantin, b. indol, c. benzen,

2.3.6. *Dehalogenări*

Dehalogenări se produc în mod curent în metabolizarea unor insecticide halogenate ca DDT. Anestezice volatile ca halotan, metoxifluran sînt dehalogenate reductiv într-o mare măsură [147].

2.3.7. *Acetilarea*

Acetilarea este un proces general de metabolizare a aminelor aromatice, sulfonamide, producînd derivați N_1 și N_4-acetilați. Hidrazida acidului izonicotinic este în cea mai mare parte metabolizată pe această cale [57]. În ficat și rinichi s-au găsit deacetilaze, care catalizează hidroliza derivaților acetilați [60]. În acest sens, excreția derivaților acetilați conjugați este dependentă de competiția dintre acetilarea predominant hepatică și deacetilarea predominant renală.

2.4. Mecanisme de conjugare

Prin reacții sintetice de conjugare, medicamentele și alți compuși exogeni sau metaboliții lor întră în a doua fază a metabolizării lor, etapă necesară eliminării și predominării caracterului hidrofilic. Conjugarea se realizează prin combinarea metaboliților medicamentelor (uneori chiar a formelor inițiale) cu substraturi endogene ca acid glucuronic, glutation redus, sulfați, glicocol, prin acilare sau metilare. Această reacție se produce prin adăugarea substraturilor menționate la o grupă funcțională a medicamentului transformat, ca de exemplu grupări OH, NH_2, COOH, epoxid, halogeni etc., rezultînd o moleculă mai polară. Conjugarea este un proces enzimatic, în care substratul endogen este transferat de la coenzimele participante în metabolismul intermediar, iar enzimele implicate în transfer sau conjugare sînt specifice unui anumit tip de reacție.

2.4.1. *Sinteza de glucuronizi*

Conjugarea cu acidul glucuronic constitue calea cea mai importantă pentru excreție și se produce la toate mamiferele și vertebratele cu excepția peștilor. Ca și în alte conjugări, formarea glucuronizilor are loc în două etape, implicînd în primul rînd biosinteza donorului, coenzimă, uridindifosfat-glucuronat (UDPGA), urmată apoi de transferul jumătății glucuronil de la UDPGA la metabolit (fig. 2.14).

Formarea glucuronizilor are loc mai ales în ficat și într-o mai mică măsură în rinichi, tractul gastrointestinal, piele. Enzimele care sintetizează UDPGA sînt localizate în citosol, iar transglucuronilaza în microzomi.

UDPGA servește ca donor de grup glucuronil pentru substraturi variate endogene ca bilirubină, estronă, testosteron, tiroxină, cît și pentru metaboliții unor medicamente cu structură fenolică, alcooli, acizi producînd *O*-glucuronizi, *N*-glucuronizi (anilină, sulfonamidă, sulfatiazol meprobramat) sau *S*-glucuronizi (tiofenol, Antabuse). În toate aceste reacții se produce un atac nucleofilic de la un atom bogat în electroni (O, N, S) asupra carbonului 1 din UDPGA. Glucuronizii conjugați au o configurație β și sînt hidrolizați de β-glucuroni-

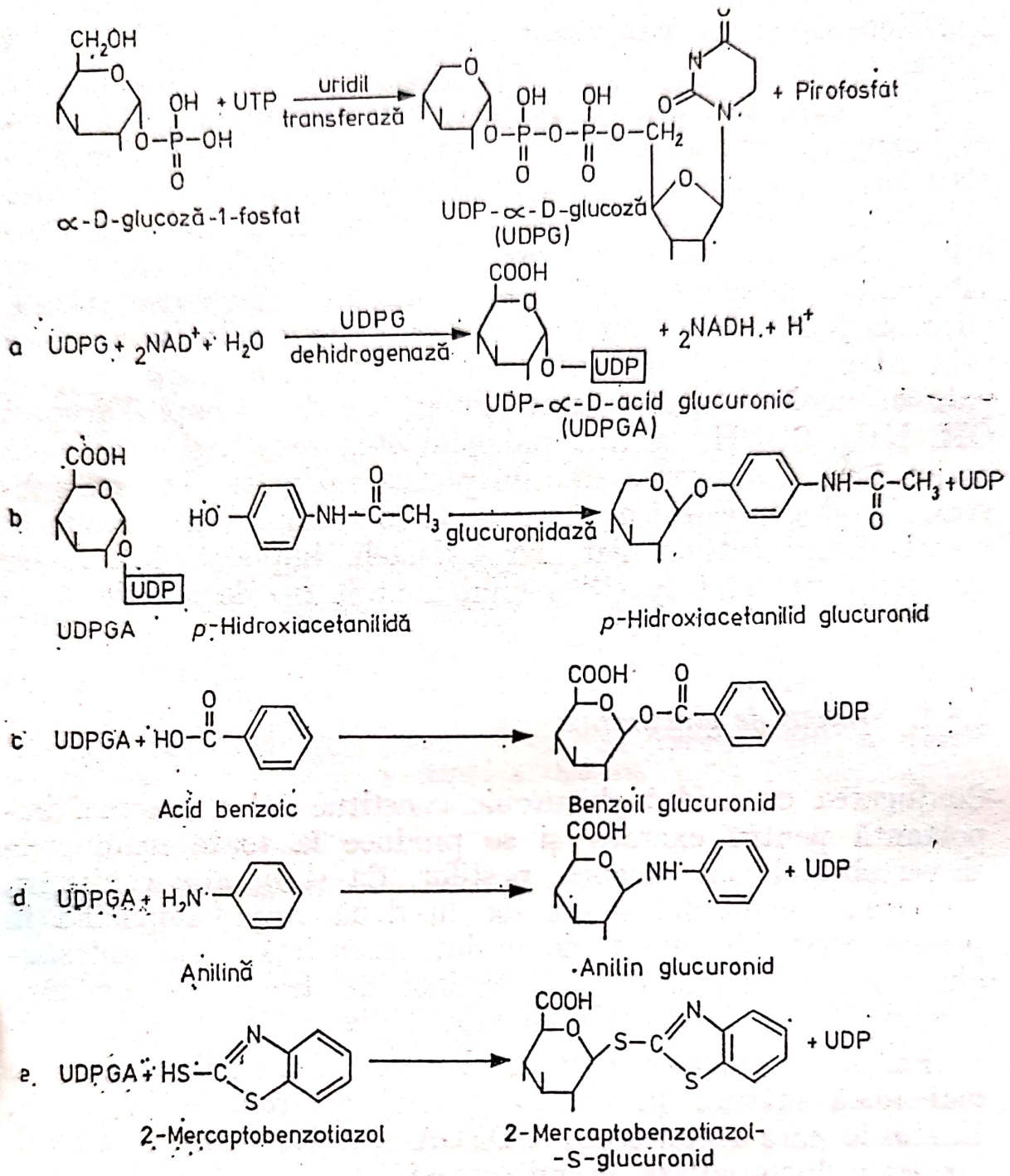


Fig. 2.14. Formarea glucuronizilor în cazurile unor compuşi exogeni; a. biosinteza UDPGA şi exemple de glucuronidare; b. *p*-hidroxiacetanilidă; c. acid nezoic; d. anilină; e. 2-mercaptobenzotiazol

dază, producînd acidul glucuronic liber şi agliconi. Această enzimă, localizată în toate organele, acţionează mai ales în activarea hormonilor inactivi. Acidul glucutonic liber, neconjugat, este excretat la mamifere după administrarea unor compuşi exogeni ca barbitonă, cloretonă, anilină [40].

Glucuronizii excretați prin bilă pot fi hidrolizați de β-glucuronidaza intestinală și agliconii pot fi reabsorbiți producîndu-se astfel un ciclu enterohepatic, cunoscut deja pentru bilirubină.

2.4.2. *Esteri sulfați*

O largă varietate de compuși cuprinzînd fenoli alcooli alifatici, sulfamați, steroizi sînt eliminați pe această cale. Biosinteza acestor esteri se face prin transferul de la adenozin-3-fosfat-5-fosfosulfat (PAPS) la un fenol, alcool sau amină de către sistemul de enzime transferante (sulfo-transferază, sulfokinază) (fig. 2.15).

Hidroliza enzimatică a esterilor sulfat este catalizată de sulfataze, din care cele mai cunoscute sînt aril-sulfataze.

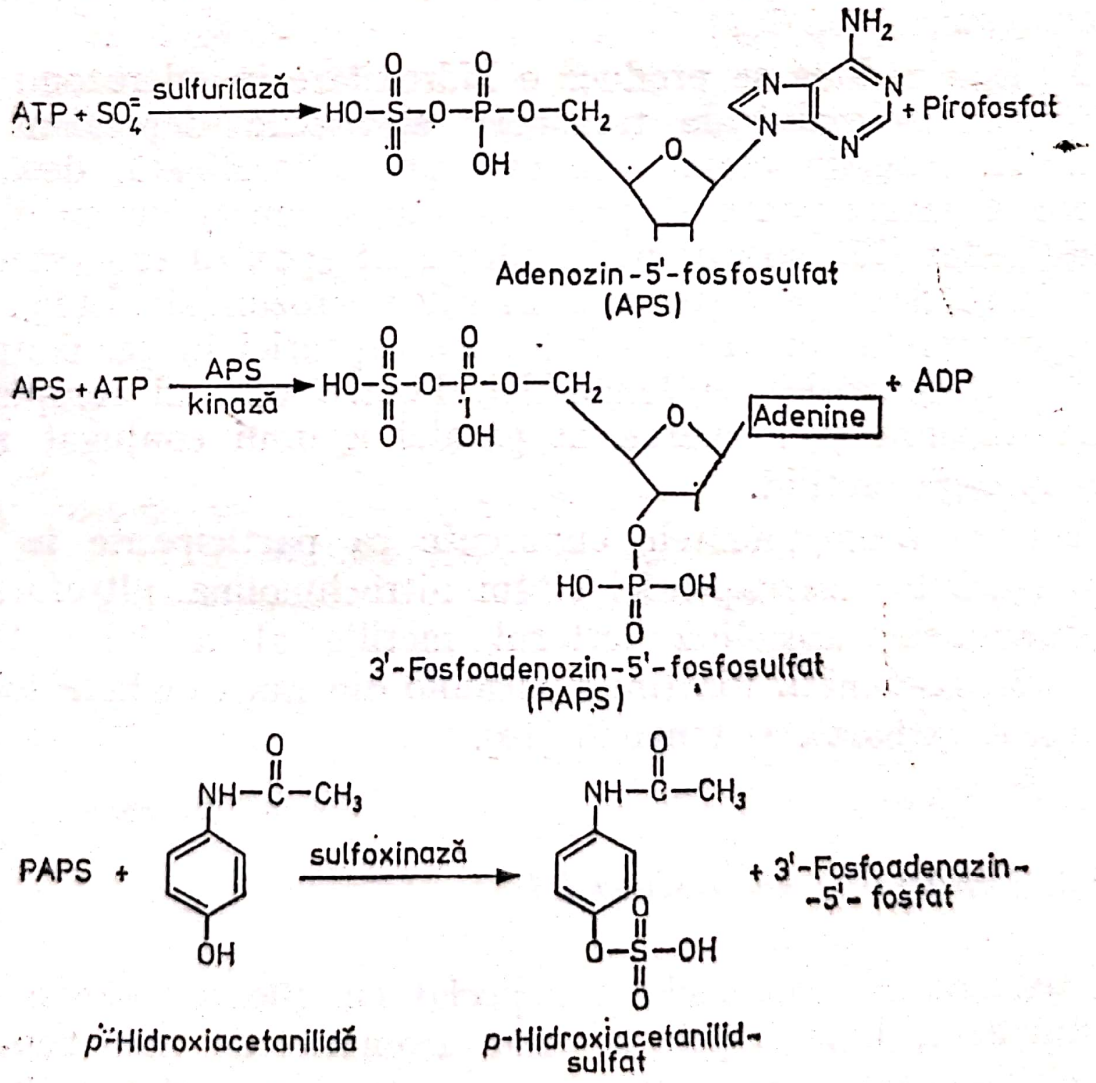


Fig. 2.15. Mecanismul formării esterilor sulfați

2.4.3. *Acizi mercapturici*

Medicamente sau compuşi exogeni avînd la bază nuclee aromatice, în special nitrobenzeni halogenaţi, sînt excretaţi prin urină ca derivaţi cisteinici acetilaţi. Într-o primă fază se pare că este necesară activarea substratului sub formă de epoxid, urmată de conjugarea cu glutationul redus sub influenţa glutation-*S*-transferazelor, cunoscute anterior ca aril, alchil, aralchil-epoxid-transferaze [25, 117]. Existenţa epoxizilor a fost demonstrată în bilă de Boyland şi Sims [14] sub forma unor derivaţi naftoli 1,2-hidroxilaţi numiţi „acizi premercapturici", iar specificitatea lor recentă discutată [25]. Aceste transferaze sînt destul de heterogene [117], iar recent Ketterer [85] a găsit o proteină numită ligandină din fracţiunea solubilă a ficatului. Această proteină se combină covalent printr-un rezidiu cisteinil cu bromosulfonftaleină, cu metaboliţi ai unor medicamente şi carcinogeni.

În faza a doua se produce o hidroxilare în microzomi sub influenţa sistemului de transport electronic dependent de NADPH. Această etapă nu este precis localizată, deoarece în multe cazuri poate să preceadă etapa conjugării cu glutationul redus [15], cu atît mai mult cu cît epoxizii sînt intermediari destul de răspîndiţi în hidroxilările microzomiale. În fig. 2.16 este prezentată formarea acizilor mercapturici în cazul naftalinei şi a benzotiazolsulfonamidei. Pentru ultimul compus se poate observa şi formarea în paralel a unui conjugat mixt mercapto-glucuronid.

Printre medicamentele cunoscute ca participante în formarea acizilor mercapturici cităm nitrochinolina, nitrofuranii, sulfonamidele, arecolina (esterul metilic al acidului 1,2,5, 6-tetrahidro-1-metil nicotinic), alcaloid din nuca de betel folosit ca agent cathartic şi teniacid [16].

2.4.4. *Conjugarea cu aminoacizi*

Conjugarea cu aminoacizi în special cu glicocol este o cale destul de răspîndită printre acizii aromatici de tipul benzoic, salicilic sau nicotinic, cu formare de acizi hipurici (fig. 2.17).

Scanned with OKEN Scanner

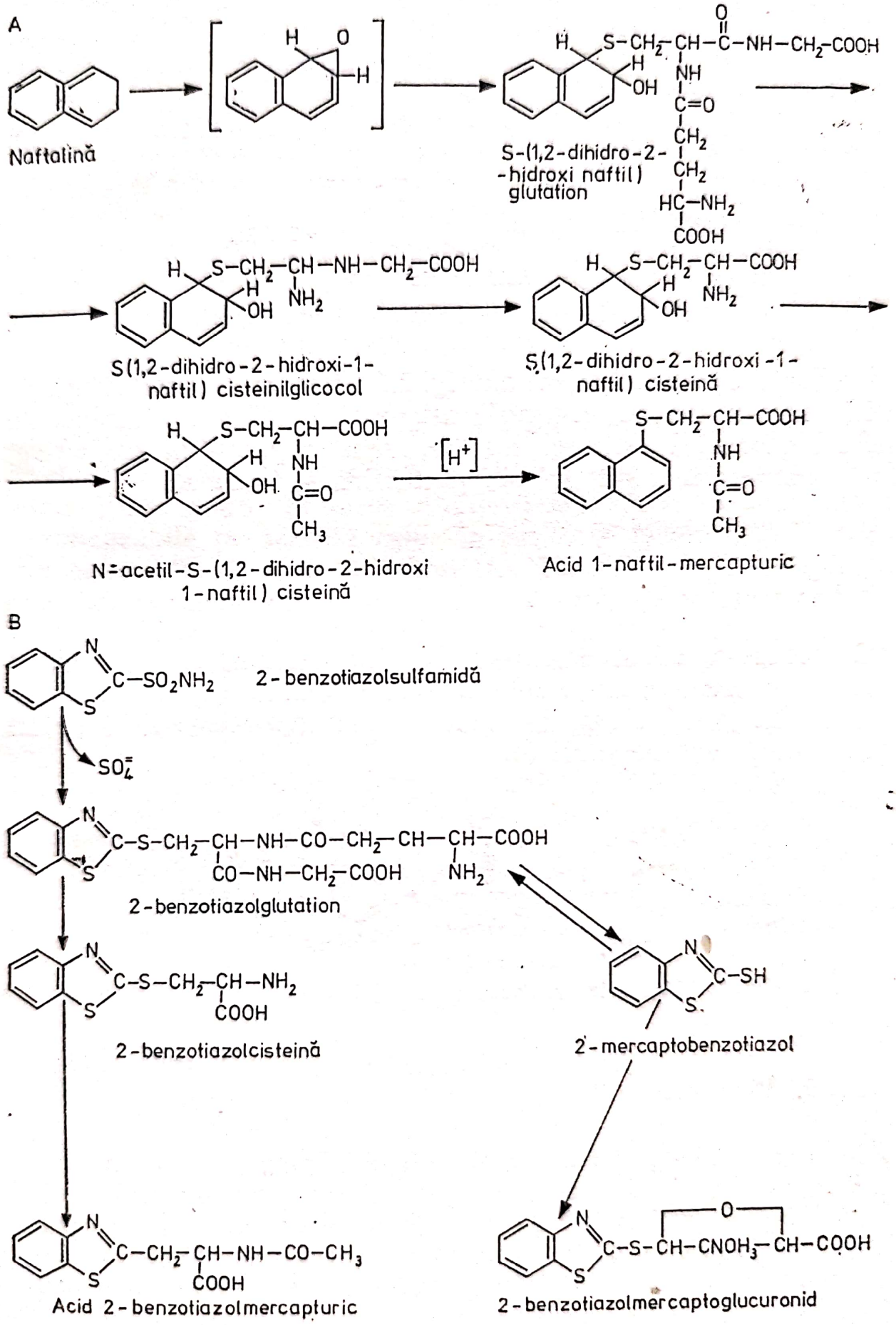


Fig. 2.16. Formarea acizilor mercapturici; A. naftalină; B. 2-benzotiazolsulfamidă,

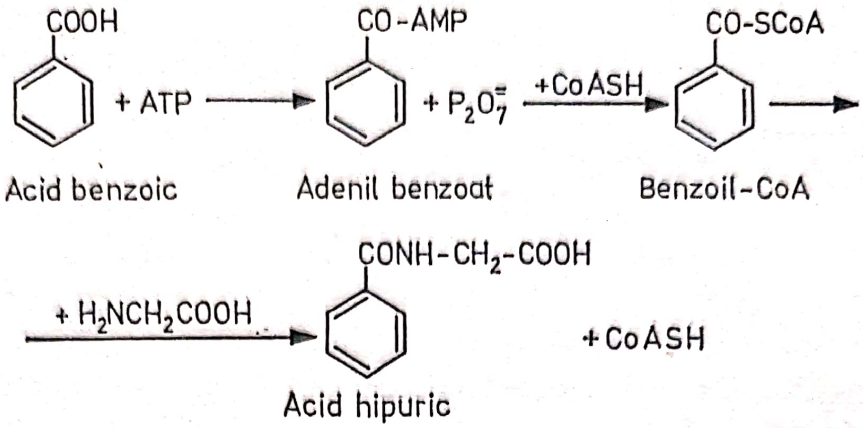


Fig. 2.17. Mecanismul formării acidului hipuric

După cum se observă din fig. 2.17, formarea acidului hipuric implică un consum energetic asigurat de ATP și coenzima A. Deși glicocolul este cel mai frecvent implicat în conjugare, a mamifere mai sînt folosiți glutamina și taurina.

2.4.5. *Acilarea*

Coenzima A a fost descoperită de Lipmann în 1945 în cursul studiului metabolizării sulfanilamidei (fig. 2.18).

Pe lîngă sulfanilamidă și alte amine aromatice suferă acilări în cursul metabolizării lor.

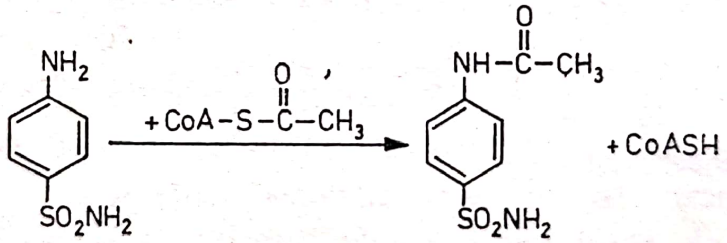


Fig. 2.18. Acilarea sulfamidei

2.4.6. *Metilarea*

Metilarea implică transferul grupării metil de la coenzima *S*-adenozilmetionină la amine, fenoli și tioli formînd conjugați *N*, *O* și *S*-metil. *S*-adenozilmetionina este biosintetizată din metionină și ATP, iar gruparea metil este transferată stereospecific de metil-transferaze unor acceptori cum ar fi cate-

colamine și alte amine psihogene (bufotenina) (cap. 6), dimercaptopropanolul (BAL), mercaptanii, tiouracilul, compușii cu seleniu etc.

Cînd doza unor medicamente este mult crescută, distribuția metaboliților poate fi schimbată datorită interacțiilor diferitelor sisteme de conjugare și a capacității de saturare ce poate fi depășită [93, 149]. Glucuronizii proveniți din metabolizarea unor medicamente inhibă UDP-glucuroniltransferaza [65], dar și prin esteri sulfați [93]. După cît se pare derivații conținînd rezidii sulfat sau glucuronil competiționează pentru centrul glucuronil donor al enzimei, partea liofilică a conjugatului fiind necesară pentru inhibiție.

Interacții între diferitele căi de metabolizare ale unui medicament apar nu numai între sisteme de conjugare, dar și la alte nivele, cum ar fi cel al sistemelor hidroxilante. Cu ocazia prezentării inducției enzimatice au fost amintite cazuri de interacțiune mixtă în urma administrării unor medicamente metabolizabile pe această cale. În realitate fazele I și II nu sînt chiar atît de riguros delimitate. De exemplu, fenacetina este metabolizată prin hidroxilare și conjugare cu acidul glucuronic și glicocol, predominînd prima cale metabolică (fig. 2.19).

În general medicamentele sînt metabolizate prin mai multe căi metabolice, dintre care una predomină. Ca și în multe cazuri ale unor compuși naturali, în cazul blocării sau insuficienței

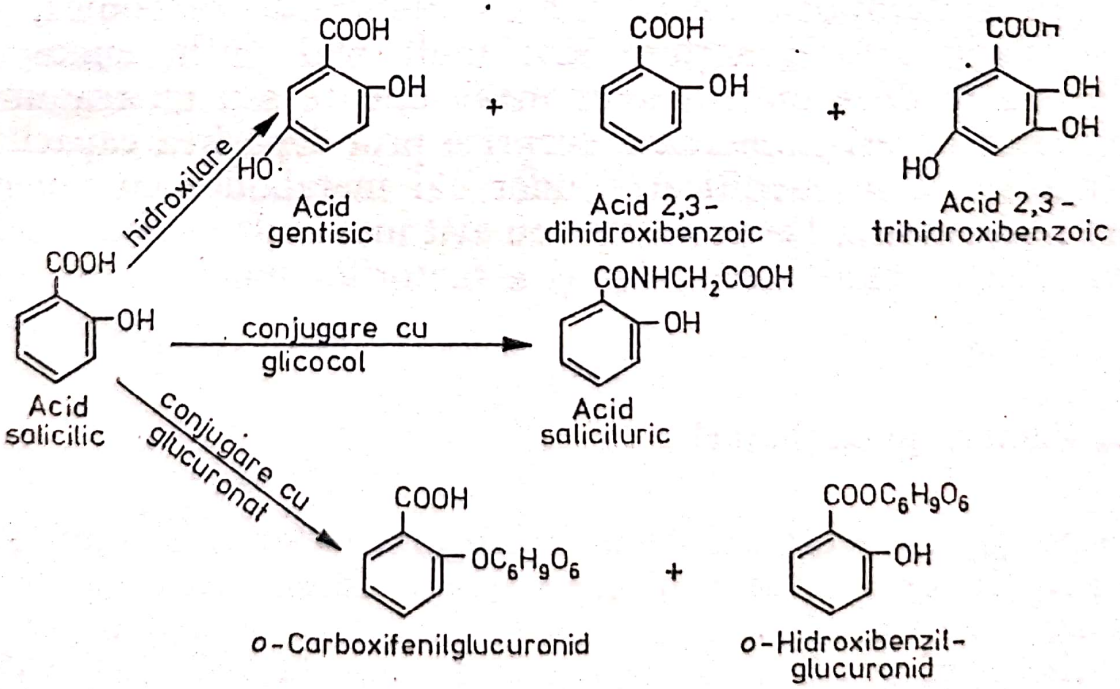


Fig. 2.19. Metabolizarea acidului salicilic

unor factori necesari (coenzime de exemplu) și pentru medicamente există posibilități multiple metabolice, în care o cale minoră poate deveni majoră. În cazul primei etape de metabolizare această adaptabilitate este mai greu de urmărit, în schimb pentru reacțiile de conjugare analiza cromatografică a metaboliților excretați poate oferi deseori surprize atît de ordin cantitativ, cît și calitativ. De obicei pentru un medicament sînt posibile aproape toate căile de conjugare. Astfel acidul *p*-aminosalicilic(PAS) folosit în tratamentul antituberculos este excretat în formă neschimbată, ca acetamidosalicilat, *p*-acetamidoglucuronid, acid *p*-aminosaliciluric și *p*-aminosalicilglutamină.

Cloramfenicolul este excretat mai ales sub formă de glucuronid și mai puțin ca derivat deacetilat și dehalogenat (fig. 2.20 a) sau redus (fig. 2.10 b). Hidrazida acidului izonicotinic (izoniazid) la om, este metabolizată prin acetilare și hidroliză sau metilare (fig. 2.20 b).

În cazul cloramfenicolului, medicamentul este metabolizat direct prin sistemele de conjugare aparținînd „clasic" fazei a II-a, iar izoniazidul este metabolizat fără intervenția sistemelor hidroxilante microzomiale. Astfel de exemple sînt foarte numeroase și încă în curs de studiu. Cel mai puțin studiate sînt însă efectele biochimice directe sau indirecte asupra unor sisteme enzimatice *in vivo*. În linii mari se știe de exemplu că iproniazidul inhibă monoamin-oxidaza și că compușii ce posedă o grupare sulfamidică liberă inhibă anhidraza carbonică, dar consecințele acestei acțiuni sînt mult mai puțin cunoscute. Folosirea în doze mari a unor medicamente sau un tratament mixt poate oferi numeroase surprize prin depășirea capacității metabolice, prin modificarea unor căi metabolice cu repercusiuni neașteptate. De aceea este cu atît mai mult necesar studiul metabolizării medicamentelor și a factorilor modificatori.

2.5. Factori perturbatori

Durata și intensitatea acțiunii medicamentelor și a compușilor exogeni în general sînt în mare parte determinate de viteza cu care aceștia sînt metabolizați. Accelerarea sau inhibarea metabolizării pot fi datorate prezenței unor factori modificatori din care menționăm pe cei mai importanți.

Scanned with OKEN Scanner

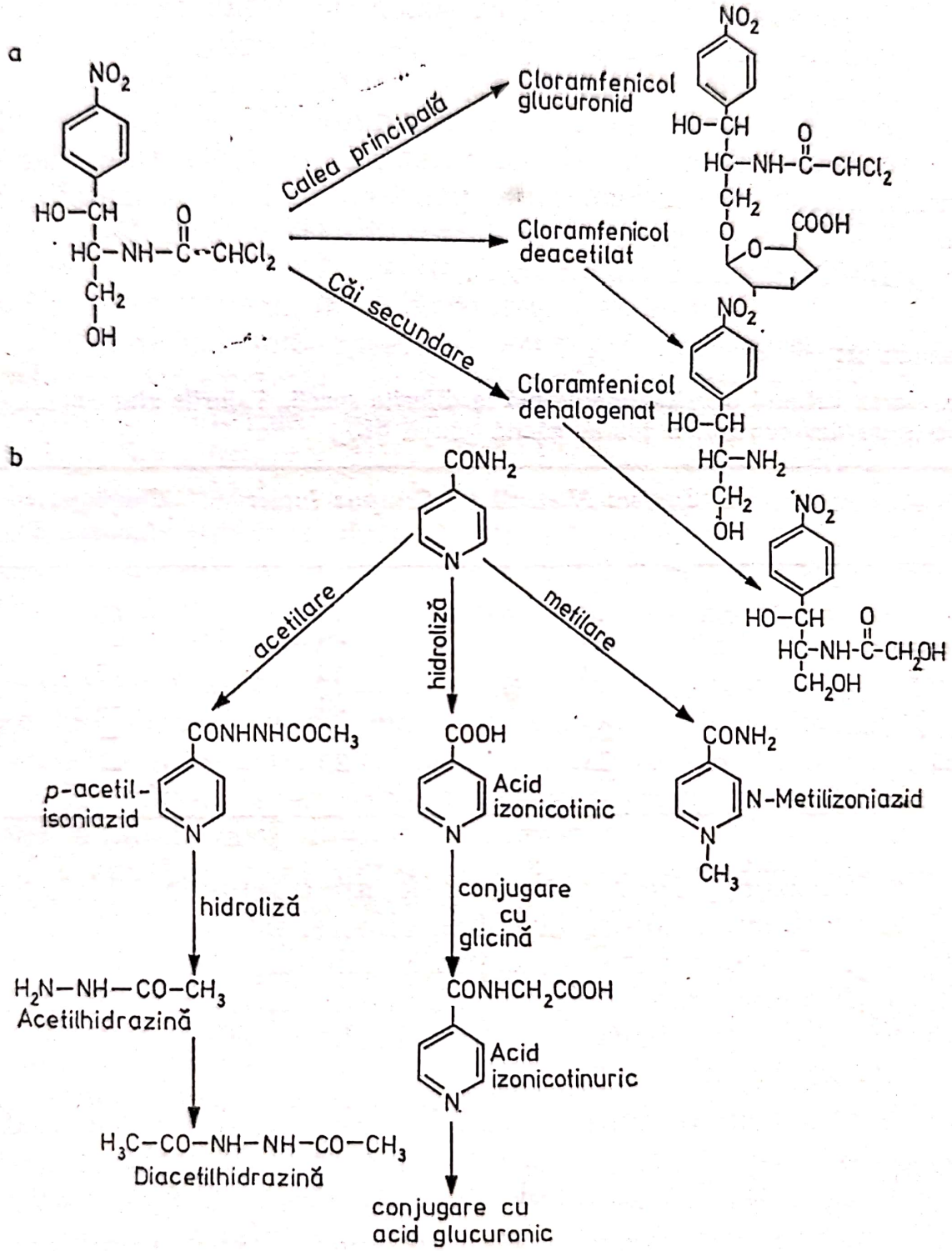


Fig. 2.20. Metabolizări pe căi diferite ale unor medicamente; a. cloramfenicol; b. izoniazid.

2.5.1. *Factori genetici*

2.5.1.1. Specia

Studiile filogenetice au arătat că sistemele metabolice implicate în metabolizarea medicamentelor s-au desvoltat ca răspuns la necesitățile vieții terestre, fapt menționat cu ocazia discutării inducției enzimatice. Printre mamifere s-au observat diferențe destul de mari atît ca viteză de metabolizare, dar și asupra căilor metabolice și a ponderii lor. De exemplu, în tabelul III sînt prezentate ponderea diferitelor căi de excreție ale sulfadimetoxinei (madribon).

TABELUL III

Eliminarea urinară a sulfadimetoxinei la diferite specii. Valorile sînt exprimate procentual din cantitatea totală găsită (după [40])

Specia	*Derivat N-acetilat*	*Compus intact*	*Conjugat glucuronid*
Om	10	10	80
Șobolan	60	40	—
Iepure	80	13	7
Cobai	70	30	—
Capră	20	80	—
Vacă	75	25	—

Fenilbutazona, agent antireumatic, are o semiviață biologică de 3 ore la iepure, 6 ore la cobai, cîine și porc și de 3 zile la om [137]. Mari diferențe, ca acțiune, semiviață biologică și căi diferite de metabolizare au fost observate la numeroase medicamente, din care menționăm: hexobarbital, efedrină, meperidină, etilbiscoumarinacetat etc.

Diferențele mari dintre specii față de metabolizarea medicamentelor unanim recunoscute ridică o serie de probleme cum ar fi în primul rînd extrapolarea testărilor unui nou medicament de la animal la om, experiment inevitabil și obligatoriu. În cazul 2-acetilaminofluorenului, la mamifere, acesta este metabolizat în *N*-hidroxi-2-acetilaminofluoren, cancerigen, și în 7-hidroxi-2-acetilaminofluoren, necancerigen. Ponderea aces-

tor două căi de metabolizare diferă foarte mult în funcție de specie [126]. Cele menționate sugerează pe de o parte marea variabilitate a metabolizării compușilor exogeni, iar pe de altă parte relativa extrapolare a datelor obținute pe animale la om [155].

2.5.1.2. Factori individuali

Diferența în susceptibilitatea individuală la medicamente, toxice, coloranți, idiosincrazia manifestă a unor indivizi sînt rezultatul detoxifierii variate, uneori defectuoase, datorită conținutului variat în echipament enzimatic.

Factorul cel mai răspîndit este polimorfismul enzimatic, existența demonstrată recent la multe enzime a unor forme moleculare multiple, separabile electroforetic, cu activitate diferită. S-a găsit că derivații hidrazinei (izoniazid), hidralazina, sulfonamidele, care sînt metabolizați prin acetilare, prezintă un polimorfism datorit acetil-transferazei hepatice care împarte oamenii în „dezactivatori rapizi și înceți" [44]. Dezactivatorii „înceți" prezintă o eficacitate mai mare terapeutică, dar și o toxicitate mai mare decît cei „rapizi". Alte variante genetice au mai fost observate la pseudocolin-esterază, enzimă care hidrolizează mulți esteri și dezactivează medicamente ca relaxantul muscular, succinilcolină. Un deficit în această enzimă la indivizi susceptibili produce perturbări respiratorii în urma administrării unor doze normale.

La șobolani s-au observat diferențe individuale mari în metabolizarea antipirinei prin hidroxilare [148]. Sușa Gunn a șobolanilor de rasă Wistar nu pot forma glucuronizi ai bilirubinei și acidului benzoic. Pacienții cu sindrom Crigler-Najjar sau Gilbert au de asemenea o activitate redusă a glucuronosiltransferazei și o tendință spre icter cronic, declanșat mai ales de medicamente ce se elimină pe această cale (salicilat, cloramfenicol).

Cele mai cunoscute deficite congenitale la om sînt acelea localizate la nivelul hematiei, în special a glucozo-6-fosfatdehidrogenazei, cu grade diferite asigurate de 17 fenotipuri observate [122]. Indivizii cu un astfel de deficit prezintă accidente la tipul de fasole *Vicia fava* și la medicamente antimalarice ca primachin, pamachin sau coloranți de tip anilină,

Scanned with OKEN Scanner

hidrazină, chinone și în general compuși care produc prin metabolizare H_2O_2, ca produs secundar [28, 142].

Variații individuale se observă în mod curent în metabolizarea unor medicamente, rezistența la alcool, narcotice, inducția enzimatică. Tot în acest domeniu menționăm formarea rezistenței la insecte, în care insecticidul acționează prin selecția membrilor unei populații care au supraviețuit, și care vor fi rezistenți și la alte insecticide încă nefolosite, dar metabolizabile pe aceeași cale [153].

2.5.2. *Factori fiziologici*

2.5.2.1. Vîrsta

Vîrsta intervine mai ales la nivelul metabolizării medicamentelor prin sistemele hidroxilante microzomiale aproape inexistente la fetus și la nou-născuți. Aceste enzime apar în prima lună de la naștere, declanșate chiar de actul nașterii. Conjugarea prin acid glucuronic se dezvoltă după 6 săptămîni și accidentele tragice provocate de administrarea cloramfenicolului sau icterele rezultate din administrarea sulfonamidelor acetanilidei, vitaminei K s-au datorat insuficienței sistemelor enzimatice necesare la nou-născuți [152].

Invers, icterele noilor născuți pot fi tratate prin administrarea unor doze mici de fenobarbital, clorpromazină pentru inducerea enzimatică.

2.5.2.2. Sexul

În cazul multor medicamente sau compuși exogeni s-a observat că șobolanii masculi metabolizează mai repede decît femelele unele medicamente ca hexobarbital, pentobarbital, aminopirină, morfină. Dealtfel și la om femeile sînt mai susceptibile la intoxicații cu amidopirină, benzen [30]. Diferența în metabolizare se datorește hormonilor sexuali și poate fi abolită prin castrare. Administrarea androgenilor la șobolani femele produce creșterea activității sistemelor hidroxilante la nivelul masculilor. Metabolizarea unor medicamente se face mai rapid

la masculi, în schimb acțiunea acestora este mai prelungită la femele. Șobolanii femele pot fi adormite cu cloroform fără efecte dăunătoare, pe cînd la masculi cantități minore produc leziuni fatale. Kato și colaboratorii [82—84] au observat că numai demetilaza aminopirinei este stimulată de androgeni, efectul lor fiind minim asupra hidroxilazei anilinei. Amintim că aceste două substanțe dau schimbări de spectru diferite (tip I și II) prin adăugarea unei suspensii de microzomi. S-ar părea că hormonii androgeni pot stimula unele din sistemele enzimatice cuplate sistemului de transport electronic microzomial.

2.5.2.3. Graviditatea

Graviditatea produce în general micșorarea metabolizării unor medicamente ca pethidina la femeie [35], cumarină, fenacetină, aminopirină la iepuroaică. Juchau și Fouts au remarcat inhibarea unor sisteme enzimatice microzomiale de către steroizi contraceptivi [77]. În timpul gravidității (ultima perioadă) conjugarea glucuronizilor este mult micșorată, datorită probabil prezenței în cantități crescute a progesteronei și pregnandiolului, cunoscuți inhibitori ai glucuronil-transferazei.

În general modificări hormonale variate (tiroxină, steroizi, catecol amine) afectează doar metabolizarea medicamentelor a căror hidroxilare microzomială poate fi crescută de androgeni [82].

2.5.3. *Factori de mediu*

2.5.3.1. Starea și felul nutriției

Ca și în cazurile precedente, activitatea enzimelor microzomiale este cea mai afectată de starea nutritivă. La șoareci inaniția scade viteza hidroxilării acetanilidei, demetilării meperidinei, metabolizării hexobarbitalului, adică a sistemelor influențate de androgeni. În schimb la femele, inaniția crește activitatea enzimelor microzomiale [83].

Scanned with OKEN Scanner

Introducerea hidroxilării microzomiale implică creșterea sintezei proteice și a acidului ribonucleic. În cazul unei diete sărace în proteine, inducția va fi scăzută [94]. Un regim sărac în proteine sau calciu produce de asemenea o scădere a inducției, iar toxicitatea aspirinei crește într-un regim sărac în proteine sau magneziu [151]. Mulți componenți ai hranei pot fi inductori, cum sînt antioxidanții, acizii grași, etanolul.

2.5.3.2. Stress

Condiții vitrege de mediu, ca frigul, zgomotul produc creșteri ale activității sistemelor enzimatice microzomiale, datorită medierii arcului reflex hipofiză-suprarenală [39]. Astfel se știe că stressul modifică concentrația în acid ascorbic a suprarenalei, iar schimbări asemănătoare au fost observate după tratarea animalelor cu fenobarbital. Expunerea șobolanilor timp de 7 zile la 4°C produce o creștere a hidroxilării anilinei paralelă cu creșterea în acid ascorbic a suprarenalei. În plus, animalele cu scorbut prezintă o metabolizare scăzută a multor medicamente, restaurată prin tratament cu vitamina C.

2.5.3.3. Iradierea

Iradierea deși produce un stress, deci crescînd activitatea sistemelor enzimatice microzomiale, totuși s-au observat mai ales inhibiții ale metabolizării medicamentelor datorită efectului radiațiilor ionizante asupra formării NADPH (cap. VII), cît și asupra conjugării cu acidul glucuronic [139].

2.5.3.4. Compuși exogeni

După cum s-a arătat la partea dedicată inducției enzimatice, metabolizarea medicamentelor poate fi crescută prin prezența unor compuși exogeni prezenți în alimentație sau în mediul înconjurător. Insecticide, coloranți, antioxidanți, hidrocarburi policiclice, compuși nenutritivi din hrană ca safrolul etc. sînt

inductori puternici, fiind capabili (prin administrare repetată) să producă creșterea metabolizării unor medicamente de 2—10 ori [30].

Ritmul circadian influențează metabolizarea medicamentelor. Se pare că viteza maximă ar fi în jurul orei 2 a.m. și cea minimă la ora 14. Aceste variații par a fi legate de variația secreției suprarenalei.

Prin cunoașterea căilor de metabolizare ale medicamentelor se pot evita accidente datorită inducției încrucișate, se poate prelungi durata acțiunii unui medicament, se poate cunoaște fenomenul de toleranță individuală, se poate micșora eventuala toxicitate sau se poate varia schema de tratament. În condițiile creșterii consumului de medicamente, a poluării din ce în ce mai mari și variate, cunoașterea mecanismelor de metabolizare, de detoxifiere capătă o importanță majoră.

BIBLIOGRAFIE

1. R. Albrecht, *Therapie*, **27**, 751 (1972).
2. J. G. Allen, N. J. Blockburn, S. M. Calwell, *Xenobiotica*, **1**, 3 (1971).
3. A. P. Alvarez, G. Schilling, R. Kuntzman, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **163**, 417 (1968).
4. A. P. Alvarez, C. J. Parli, G. J. Mannering, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 1037 (1973).
5. B. N. Ames, P. Sims, P. L. Grover, *Science*, **176**, 47 (1972).
6. M. W. Anders, *Ann. Rev. Pharmacol.*, **11**, 37 (1971).
7. J. Baubnik, O. Michel, R. Michel, *Biochimie*, **55**, 323 (1973).
8. W. R. Bidlack, A. L. Tappel, *Lipids*, **7**, 564 (1972).
9. W. R. Bidlack, R. T. Okita, P. Hochstein, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **53**, 459 (1973).
10. H. S. Black, W. Lo, *Nature*, **234**, 306 (1971).
11. K. W. Bock, W. Frohling, H. Remmer, *Biochem. Pharmacol.*, **22**, 1557 (1973).
12. J. Booth, E. Boyland, *Biochem. J.*, **91**, 362 (1964).
13. E. Boyland, P. Sims, *Biochem. J.*, **68**, 440 (1958).
14. E. Boyland, P. Sims, *Biochem. J.*, **84**, 571 (1962).
15. E. Boyland, W. Williams, *Biochem. J.*, **94**, 190 (1965).
16. E. Boyland, R. Ney, *Biochem. J.*, **113**, 123 (1969).
17. G. D. Breck, W. F. Trager, *Science*, **173**, 544 (1971).

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 3

SISTEMUL COLINERGIC

3.1. Sinteza acetilcolinei

Realizarea de către acetilcolină (Ach) a funcției de neurotransmițător la diverse nivele ale sistemului nervos central și periferic implică disponibilitatea sa. La rîndul său această disponibilitate este dependentă de o serie de procese complexe interrelate într-o anumită succesiune: sinteza acetilcolinei, transportul colinei, depozitarea Ach, eliberarea sa, cuplajul depolarizare-eliberare, interacțiunea cu receptorul colinergic, terminarea acțiunii Ach prin recaptare și hidroliză enzimatică etc.

Dezvoltarea farmacologiei domeniului colinergic și a cunoștințelor privind mecanismele biochimice ale diverselor substanțe farmacodinamic active evidențiază posibilitatea interferenței cu oricare dintre verigile enumerate mai sus într-o manieră mai mult sau mai puțin specifică. Încercăm să prezentăm în continuare mecanismele biochimice principale implicate în farmacodinamia sistemului colinergic.

3.1.1. *Colinacetil-transferaza*

3.1.1.1. Localizare

Colinacetil-transferaza (Colin-acetilaza), enzimă cu două substraturi, catalizează reacția dintre acetil-CoA și colină:

$$\text{Acetil-CoA} + \text{Colină} \rightleftharpoons \text{Ach} + \text{CoA}.$$

Studii complexe efectuate în ultimii ani au avut drept scop precizarea mecanismului de acțiune al colin-acetilazei, proprietăților sale cinetice, localizării sale, interrelațiilor sale cu membranele intracelulare, a structurii sale moleculare etc.

Scanned with OKEN Scanner

Colin-acetilaza a fost pusă în evidență histochimic, intracelular, asociată ribozomilor și neurofilamentelor iar în terminațiile nervoase în vecinătatea veziculelor sinaptice. Colin-acetilaza este o enzimă localizată în stare liberă în citoplasmă, loc unde dealtfel se produce și sinteza acetilcolinei [64, 171]. Malthe-Sorenssen și Fonnum [64] au descris 3 forme moleculare diferite de colin-acetilază în creierul de șobolan, cu sarcini de suprafață diferite. Măsura în care, în condiții fiziologice, colin-acetilaza este legată de membrane este de mare importanță pentru înțelegerea echilibrului dintre diferitele localizări ale acetilcolinei intracelulare, depozitarea vezicular a acesteia etc.

3.1.1.2. Mecanism

Din datele de cinetică prezentate de White și Wu [170] rezultă un mecanism secvențial de acțiune al colin-acetilazei, în care ambele substraturi se combină cu enzima înaintea generării vreunui produs. Aplicarea teoriei Theorell-Chance pentru analiza colin-acetilazei din diferite țesuturi umane arată că cele două substraturi se leagă de enzimă într-o ordine precisă, acetil-CoA fiind primul substrat care se supune acestui proces.

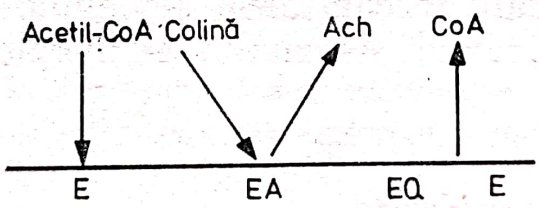


Fig. 3.1. Mecanismul THEORELL-CHANCE pentru colin-acetilază; E — enzima liberă; EA și EQ — complexe enzimatice tranzitorii

Datorită similitudinii structurale a acetilcolinei și colinei, Ach poate să acționeze atît ca analog de substrat cît și ca produs inhibitor — respectiv Ach se poate lega atît la complexul EA cît și la complexul EQ.

Unii autori presupun dependența sintezei de acetilcolină de raportul dintre Ach și colină [84] sau de legea acțiunii maselor [133, 134]. Datele recente ale lui Collier și col. [33, 34, 35] arată un raport molar al colinei față de acetilcolină menținut în apropierea valorii de 5 în timpul sintezei Ach.

3.1.1.3. Efectul inhibitorilor SH

Afectarea grupărilor tiolice prin oxidare, formarea de mercaptide sau alchilare duce la inhibiția reversibilă a colin-acetilazei în cazul primelor două mecanisme și ireversibilă în ultimul caz.

Studiile [110] privind eficiența acestor tipuri de inhibitori evidențiază dintre alchilanți eficacitatea *N*-metil și *N*-etil-maleinimidelor care, în concentrații de 10^{-3} M, inhibă enzima cu aproximativ 90%. Dintre substanțele oxidante acidul 5,5′,-ditiobis-(2-nitrobenzoic) (DTNB) s-a dovedit cel mai puternic iar dintre reactivii ce formează mercaptide, *p*-hidroximercuribenzoatul (PMB) este un puternic inhibitor. S-au evidențiat de asemenea efectele inhibitorii ale iodacetatului (alchilant), iodosobenzoatului (oxidant) și PMB (formare de mercaptide) precum și efectele activatoare ale preincubării cu cisteină și glutation, evidențiindu-se astfel necesitatea grupărilor tiolice libere pentru activitatea colinacetilazei.

3.1.2. *Inhibitorii specifici ai colin-acetilazei*

Interesul care-l prezintă acest tip de substanțe este generat de potențiala lor utilizare pentru analiză și elucidarea mecanismelor biochimice ale transmisiei colinergice. Astfel s-a demonstrat că bromoacetil-CoA inhibă puternic colin-acetilaza, fenomen potențat de colină.

Morris și Grewaal [120, 121] găsesc că acetilcolinele halogenate: clor, brom și iodoacetilcolina sînt puternic inhibitoare ale colinacetil-transferazei. Inhibiția este reversibilă și relativ de scurtă durată. Limitarea duratei de acțiune a acestor substanțe este generată de hidroliza lor spontană la *p*H neutru sau alcalin. Capacitatea inhibitorie a haloacetilderivaților acetilcolinei menționați variază invers proporțional cu dimensiunea halogenului substituit. (Tabelul I.)

Inhibiția slabă realizată de analogii de colină în care grupările hidroxil au fost înlocuite cu clor evidențiază faptul că grupul hidroxil nu numai că este necesar pentru esterificare, dar, împreună cu partea de azot cuaternar a moleculei, are o funcție importantă în legarea substratului de enzimă. Substituția succesivă a grupărilor metil din molecula clorocolinei

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL I

Inhibiția colinacetil-transferazei prin diferiți derivați halogenați ai acetilcolinei

După [112, 113]

Inhibitor	*Concentrația* (μM)	*Inhibiția colin-acetilazei* (%)
Cloroacetilcolina	20	65
	40	78
	62,5	92
	125	89
Bromoacetilcolina	62,5	70
Iodoacetilcolina	20	37
	40	40
	62,5	56

cu grupări etil duce la o marcată scădere a potenței inhibitorii. Remarcabilă este în acest context analogia cu modificările eficacității agonistilor colinergici derivați de colină la care grupările metil au fost substituite cu grupări etil.

Cei mai activi inhibitori *in vitro* sînt analogii stiril-piridinici [156].

Prototipul acestor derivați este *trans*-*N*-metil-4-(1-naftil-vinil) piridiniul care prezintă un I_{50} de $4,7 \cdot 10^7$ M pentru colin-acetilaza din creierul de șobolan [24].

Deoarece colin-acetilaza este exclusiv intracelulară, compușii liposolubili sînt mai eficienți inhibitori *in vivo*. Astfel, izomerii *cis* și *trans* ai naftilvinilpiridinei terțiare au eficacitate semnificativă asupra transmisiei neuromusculare după administrarea intraarterială la pisică [5].

3.1.3. *Transportul colinei*

Datele experimentale privind sinteza acetilcolinei în diferite condiții de stimulare a activității sinaptice — respectiv de eliberare a Ach, cu sau fără adaus de colină, evidențiază importanța surselor extratisulare de colină pentru sinteza normală de Ach. Sursa majoră de colină necesară sintezei de Ach este

sîngele circulant. Asigurarea necesităților de colină pentru sinteza Ach în sistemul nervos este realizată printr-un mecanism de transport mediat care operează la concentrații scăzute de colină. La nivelul terminațiilor nervoase în mod normal numai colina este recaptată, în timp ce Ach poate fi supusă acestui proces numai în prezența unui anticolinesterazic [34].

Recaptarea colinei de către terminațiile nervoase presinaptice este, în preparatul frenic-diafragm, de aproximativ 35% din colina eliberată sub formă de Ach și reutilizată pentru sinteza acesteia.

Captarea colinei este marcat intensificată de stimularea nervoasă, eficiența sistemului de captare fiind remarcabilă și realizînd un echilibru cu eliberarea Ach în condițiile stimulării la o frecvență de 20/s, timp de 5 minute [134].

3.1.4. *Inhibitorii transportului colinei*

Transportul colinei este saturabil, dependent de temperatură, necesită Na^+ în mediul extern și este inhibat competitiv de către unele substanțe farmacodinamic active. Dintre aceste substanțe se remarcă, în primul rînd, compusul α, α′-dimetiletanolamino-4,4′-biacetofenona sau hemicolina (hemicolinium -3; HC-3).

S-a admis inițial că scăderea sintezei Ach în prezența hemicolinei este o consecință a blocării sistemului de transport al colinei. Ulterior s-a arătat că acțiunea sa de blocare a transportului colinei este mică în comparație cu efectele asupra sintezei Ach [33]. După Gomez și col. [69], hemicolina acționează nu prin scăderea influxului colinei în țesutul nervos ci prin *shunt*-area *(by-pass)* colinei tisulare disponibile către metabolismul fosfolipidelor, îndepărtînd-o de procesul de sinteză a Ach.

Cert este efectul său net de scădere a sintezei de Ach cu scăderea consecutivă a conținutului și a eliberării Ach din terminațiile nervoase. Suplimentar acest fenomen generat de hemicolină este intens antagonizat de colină [134]. Efectul caracteristic al hemicolinei asupra transmisiei neuromusculare este blocarea acesteia în funcție de frecvența stimulării, implicit de golirea prealabilă a depozitelor de Ach.

Scanned with OKEN Scanner

După Di Augustine și Haarstad [47] se consideră că structura hemiacetalică a hemicolinei este responsabilă de activitatea sa. Structuri analoage cu acțiuni similare sînt derivații *N*-metilpiperidinici, *N*-alil- și 3- și 4-metilpiridinici.

Analogii cu structură liniară ai colinei sînt de asemenea asemănători ca acțiune cu hemicolina. Dintre aceștia, trietilcolina [trietil (2-hidroxietil) amoniul] este supus transportului în terminațiile nervoase și prin acetilare transformat în acetiltrietilcolină. Absența acțiunilor colinergice ale acestui compus și absența asociată a acetilcolinei duce la blocul transmisiei neuro-musculare. Tetraetil-amoniul inhibă de asemenea captarea colinei. Compușii polimetileni biscuaternari de amoniu de tipul decametoniului sînt eficienți blocanți ai producției de Ach în preparatele neuro-musculare stimulate, dar pentametoniul și hexametoniul au eficacitate redusă [21].

De remarcat că, practic, nici una din substanțele inhibitoare ale transportului colinei, nici chiar cele mai eficiente (hemicolina, trietilcolina, troxoniul), nu posedă exclusiv această proprietate ci sînt și blocanți postsinaptici antidepolarizanți.

Compușii de tip polimetilen-biscuaternari de amoniu (de exemplu decametoniul) sînt blocanți ai transmisiei neuromusculare de tip depolarizant. În afară de Ach, alți analogi de tipul metilcolinei și carbaminoilcolinei competiționează cu colina pentru mecanismul de transport.

3.2. Depozitarea acetilcolinei

Depozitele de acetilcolină denumesc în fapt Ach disponibilă pentru eliberare consecutivă stimulului nervos. În limite acceptabile aceste depozite sînt identificabile cu acetilcolina veziculară sau Ach stabil legată.

Whittaker [171, 172] sistematizează datele experimentale privind depozitele de Ach din care rezultă că pot fi separate trei depozite de Ach din omogenatele de creier:

1) Ach liberă extracelulară, care reprezintă 25% din cantitatea totală și este expusă hidrolizei catalizate de colin-esteraze.

2) Ach legată labil, eliberabilă din sinaptozomi prin șoc hipoosmotic sau prin presiune mecanică.

Scanned with OKEN Scanner

3) Ach legată stabil, conținută în veziculele sinaptice.

Acetilcolina extracelulară sau surplusul de Ach poate fi considerată un artefact, fiind evidențiabilă numai după blocarea colin-esterazelor tisulare. Locurile de sinteză ale Ach în citoplasma terminațiilor nervoase nu comunică liber cu locurile de depozitare ale Ach. Ach labil legată poate să corespundă parțial sau total cu surplusul de Ach deoarece o fracțiune semnificativă din aceasta, după ezerinizare, este eliberată de către potasiu [140]. Acest cation nu are efect specific asupra eliberării Ach din veziculele sinaptice.

Richie și Goldberg [139] aduc dovezi privind o verigă funcțională între sinteza și depozitarea Ach, arătînd că transmițătorul sintetizat în sinaptozomi din acetil-C_oA și colină marcată este mai rapid și mai eficient captat în vezicule decît Ach prealabil marcată.

În prima variantă este regăsită în vezicule 15% din Ach sintetizată iar în varianta secundă numai 1,5%. Modalitatea în care Ach sintetizată în citoplasmă este depozitată în vezicule rămîne o problemă deschisă. Numărul de molecule de Ach, estimat teoretic, existent într-o veziculă, este de maximum $6 \cdot 10^4$.

Cantitatea de mediator eliberată la placa terminală este după Potter [134] de ordinul a $3{,}5—12 \cdot 10^{-8}$ moli/placă terminală/impuls. Această cantitate împărțită la numărul mediu de cuante eliberate pe impuls furnizează limitele de $2 \cdot 10^4$ și $3 \cdot 10^5$ molecule de acetilcolină/cuantă.

Ipoteza depozitării veziculare a Ach a fost mai clar definită odată cu descrierea ciclului de membrane [17, 18, 123].

Din membrana celulară se formează prin exocitoză vezicule cu pereți netezi, aparent identice cu veziculele sinaptice, înconjurate de o pătură cu structură hexagonală. Aceste complexe veziculare fuzionează, formînd cisternele care vor genera veziculele sinaptice. Veziculele sinaptice, după eliberarea conținutului, devin parte componentă a membranei și se vor reforma prin invaginarea membranei trecînd prin stadiul de complexe veziculare. Toate componentele astfel descrise au fost evidențiate în micrografiile electronice ale terminațiilor nervoase.

Scanned with OKEN Scanner

3.3. Eliberarea acetilcolinei

Potențialele miniaturale înregistrate, în repaus, la nivelul joncțiunii neuro-musculare sînt caracteristice nu numai pentru sistemul colinergic, fiind observate și la nivelul altor tipuri de sinapse din sistemul nervos central și periferic. Aceste potențiale miniaturale [61] înregistrate în repaus, de 0,5 mV amplitudine, sînt consecința descărcării spontane a cuantelor multimoleculare la nivelul fantei sinaptice, cu o frecvență de aproximativ 1/s.

Impulsul nervos intensifică eliberarea Ach [39] prin creșterea frecvenței și sincronizarea descărcării cuantice, cu eliberarea unei cantități de Ach echivalentă cu cîteva sute de cuante. Eliberarea cuantală este astfel modalitatea esențială de eliberare a Ach și a altor mediatori chimici. Modalitatea depozitării — în vezicule — a Ach [42, 43, 44, 129] condiționează eliberarea discontinuă, cuantală. Estimarea directă a Ach din veziculele terminațiilor nervoase din electroplax sugerează existența unei soluții de Ach izoosmotică cu plasma (0,4—0,5 M), cu un număr de aproximativ 4000 molecule/vezicule [134]. Cantitatea de Ach conținută într-o cuantă, estimată pe baza analogiei cu cantitatea care declanșează micropotențialul de acțiune este de aproximativ 10^5 molecule fiind eliberate în jur de 20 cuante pe impuls nervos [100]. Nu este bine definit dacă procesele elementare electrice sînt generate de interacția membranei postsinaptice cu una sau cu mai multe molecule de Ach [91].

După Katz [90], eliberarea Ach implică următoarea secvență de fenomene: depolarizarea deschide specific „porțile calcice" din membrana terminației axonice, generînd un influx de ioni de calciu. La nivelul suprafeței interne a membranei axonale ionii de calciu inițiază eliberarea cuantală în fanta sinaptică a mediatorului conținut în veziculele sinaptice după prealabila fuziune a acetora cu membrana axonală.

3.3.1. *Cuplajul stimul-eliberare*

Cuplajul dintre fenomenul de depolarizare și cel de eliberare (secreție) este conceput actualmente a fi realizat de influxul calciului care accelerează eliberarea mediatorului. Concentrația minimă necesară de calciu ionic este de aproximativ 10^{-4} M

pentru ca depolarizarea să genereze eliberarea de Ach din terminația respectivă. Proprietatea calciului de a cupla cele două fenomene fundamentale este specifică, stronțiul, de exemplu, permițînd o anumită eliberare de Ach, secundară depolarizării dar este de 100 ori mai puțin eficient la aceeași concentrație molară cu calciul. Be^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, La^{2+} se comportă ca antagoniști competitivi ai calciului [20, 49, 80]. Relația cantitativă între concentrația de calciu și eliberarea de acetilcolină sugerează necesarul de 3—4 ioni de calciu pentru eliberarea unei cuante de transmițător de către impulsul nervos [49]. Dovezi experimentale concludente evidențiază corelația directă dintre cantitatea de Ach eliberată spontan sau per impuls și concentrația calciului extracelular [90]. O schemă posibilă [49] postulează combinația a patru ioni de calciu cu un loc anumit, neprecizat, complexul format fiind deplasat prin membrană în cursul depolarizării. Pentru acest loc receptor cu care se combină, calciul intră în competiție cu Mg^{2+} și Na^{+}. Antagonismul calciului și sodiului pare să fie nespecific deoarece și litiul manifestă o competiție similară.

Persistența potențialelor miniaturale de placă terminală în absența calciului sau în prezența unui exces de magneziu au permis lui Del Castillo și Katz [39] și Hubbard și col. [80] să postuleze existența unei mici fracțiuni a eliberării spontane, independentă de calciu.

O serie de agenți farmacologici pot interfera, prin mecanisme diferite, cu procesul de cuplaj stimul-eliberare. Mecanismul anestezicelor locale va fi discutat în continuare.

Glicozizii cardiotonici, blocînd ATPaza- Na^{+}—K^{+}, blochează astfel transportul de sodiu, realizînd implicit o acumulare de calciu intracelular. Aceasta ar putea să explice creșterea eliberării de Ach prin substanțele de tipul menționat [18].

3.3.2. *Eliberatorii de acetilcolină*

Similar cu substanțele farmacodinamice care modifică etapa de sinteză a Ach, cele care influențează procesul de eliberare a Ach acționează tot la nivel presinaptic. În acest sens se pot distinge două mecanisme: unul independent de potențialul presinaptic și, în anumite limite, independent de ionul de Ca^{2+}, și un altul dependent de acest cation. Remarcabil este

sub acest aspect efectul alcoolului etilic care crește frecvența micropotențialelor de acțiune, realizîndu-se o corelație doză-răspuns exponențială [135]. Un mecanism similar cu cel întîlnit la etanol, independent de calciu, îl realizează și alte substanțe farmacodinamic active de tipul hidratului de cloral, pentobarbitalului, uretanului, paraldehidei, cloroformului, eterului, clorpromazinei, teofilinei etc. Există pentru o parte din aceste substanțe o corelație între creșterea frecvenței micropotențialelor de acțiune și efectul de stabilizare a membranei [148]. Creșterea Ach cerebrale prin barbiturice nu poate fi atribuită hipoxiei, hipercapniei sau hipotermiei eventuale produse de aceste substanțe.

Substanțele colinergice de tipul tremorinei, oxotremorinei, sau arecolinei produc o creștere considerabilă a Ach cerebrale. Inhibiția efectului oxotremorinei prin hemicolină și contracararea efectului acesteia din urmă prin colină evidențiază implicația etapei de sinteză în creșterea conținutului de Ach. Se presupune că substanțele de tipul tremorinei acționează prin mobilizarea unui precursor de Ach dintr-un depozit neprecizat încă.

Printre substanțele care cresc eliberarea de acetilcolină pe impuls nervos fără creșterea sensibilității membrane postsinaptice la Ach se numără tetraetilamoniul. Această substanță prelungește marcat durata potențialului presinaptic, ceea ce implică creșterea numărului de cuante de Ach eliberate per impuls [98]. Structurile fenolice, inclusiv catecolaminele, au efecte asemănătoare cu tetraetilamoniul. În aceeași categorie farmacodinamică intră guanidinele care cresc cantitatea de transmițător eliberată per impuls.

În categoria eliberatorilor de Ach [54] intră de asemenea ionul K^+ în concentrații de 5—10 mM, carbaminoilcolina, fenilacetatul, acetilsilicocolina, nicotina, serotonina, ionul de Ba^{2+} etc. [75, 76].

Mecanismul de eliberare a Ach, dependent de calciu, presupune creșterea calciului intracelular care ar masca respingerea mutuală dintre sarcina pozitivă a veziculelor sinaptice și membrana terminală permițînd fuziunea celor două membrane cu creșterea frecvenței de eliberare.

Scanned with OKEN Scanner

3.3.3. *Inhibitori ai eliberării de acetilcolină*

Inhibiția eliberării de Ach prin toxina botulinică se desfășoară în două etape: inițial are loc un proces de legare urmat de blocajul propriu-zis. Prima etapă — de legare de structurile presinaptice — este relativ independentă de Ca^{2+}. A doua etapă este Ca^{2+}-dependentă și corelată cu blocarea eliberării de Ach. Prevenirea eliberării de Ach prin omisiunea Ca^{2+} sau prin adăugarea de Mg^{2+} în concentrații mari crește rezistența la blocarea prin toxina botulinică. Creșterea activității nervoase, depolarizarea prin K^+ în prezența Ca^{2+} crește însă sensibilitatea transmisiei sinaptice la blocajul prin toxina butulinică. Aceste date sugerează că, în timpul procesului de eliberare a Ach, anumite structuri moleculare sinaptice sînt expuse interacției cu toxina botulinică. O moleculă conținătoare de acid sialic, poate un gangliozid, ar putea fi receptorul toxinei botulinice [151, 152, 153, 154]. Acesta ar putea fi localizat în peretele veziculei sinaptice. O altă toxină, β-bungarotoxina, ar acționa asupra ciclului veziculelor sinaptice, blocînd procesul de formare a acestora [31].

Substanțele anestezice locale de tipul procainei reduc eliberarea transmițătorului din terminațiile sinaptice iar în concentrații mari blochează complet procesul de eliberare [112]. Acest efect este atribuit acțiunii anestezicelor locale de blocare selectivă [41], a creșterii conductanței membranei la sodiu, creștere responsabilă de prima parte a potențialului de acțiune. Această selectivitate a anestezicelor asupra conductanței la sodiu permite sugestia existenței a mai multor receptori pentru procaină în placa terminală. Anestezicele locale realizează acest efect prin interacțiune competitivă cu calciul pentru locurile negative de legare din membrană: două molecule de amină competiționează cu un ion de calciu legat de membrană. În fond anestezicele locale interferă cu toate etapele funcționale [148] în care este implicat calciul: stabilitatea electrică membranară, influxul calciului, cuplajul depolarizare-răspuns fiziologic, permeabilitatea membranelor celulare. Anestezicele locale deplasează calciul legat de fosfolipide [68], fenomen care stă probabil la baza competiției dintre acestea și calciul legat de membranele celulare.

Dintre cationi, magneziul inhibă eliberarea de Ach la terminațiile nervoase, probabil prin antagonism competitiv cu calciul.

Scanned with OKEN Scanner

3.4. Receptorul colinergic

3.4.1. *Structură, proprietăți*

Substanțele farmacodinamic active își realizează efectele prin interacțiune specifică cu structuri macromoleculare localizate uzual la nivelul membranei celulare, și care poartă denumirea generică de receptori farmacodinamici (receptori farmacologici, farmacoreceptori, farmaceptori etc.).

Receptorul farmacologic, parte componentă a unui anumit țesut, în conceptul actual, trebuie să se supună următoarelor criterii [56]:

1) Receptorul este o macromoleculă cu locuri de legare pentru o moleculă specifică endogenă sau pentru o anumită moleculă farmacodinamic activă.

2) Specificitatea locurilor de legare ale macromoleculei receptorului pentru o anumită moleculă endogenă este determinată genetic iar macromolecula receptoare are o funcție determinată genetic.

3) Legarea unui agonist, indiferent de originea sa, produce o perturbare specifică a macromoleculei receptoare, inițiindu-se un lanț de evenimente ce duc la răspuns.

4) Inițierea unui răspuns prin legarea la locul receptor nu depinde de apariția sau ruperea unei legături covalente în molecula agonistului.

Utilizarea unei toxine: α-bungarotoxina care se leagă ireversibil de receptorul colinergic dar nu de acetilcolin-esterază (AchE) a permis precizarea multor aspecte în ceea ce privește localizarea și distribuția receptorilor colinergici, interrelația cu acetilcolin-esteraza etc.

Remarcabil este în acest sens faptul că numai 2—3 % din moleculele de α-bungarotoxină sînt legate în afara plăcii terminale. Această legătură se realizează probabil cu receptorii extrinseci. Studiul legării acestei toxine la nivelul plăcii terminale în diafragmul de șobolan sugerează existența unui număr de $4 \cdot 10^7$ locuri de legare pentru Ach, corespunzător unei plăci terminale, ceea ce ar corespunde cu numărul de receptori, admițînd identitatea dintre un loc receptor și receptorul însăși.

Scanned with OKEN Scanner

Există diferențe farmacologice între receptorii intrinseci — de la nivelul plăcii (regiunea subsinaptică) și cei extrinseci — din afara plăcii terminale [40]. Se poate presupune că receptorii intrinseci leagă Ach, α-bungarotoxina și *d*-tubocuranina în timp ce receptorii extrinseci interacționează numai cu Ach și α-bungarotoxina [82].

Încercările de izolare și caracterizare a receptorului colinergic efectuate de diverși autori [25, 55, 56, 124] s-au soldat cu rezultate deosebit de interesante.

Cercetările lui De Robertis și col. [43] au evidențiat structura proteolipidică (lipoproteină cu componenta lipidică la suprafață) a receptorului colinergic. Fixarea specifică și ireversibilă a α-bungarotoxinei pe acest tip de structuri a permis izolarea atît din electroplax cît și din mușchi de mamifer a unei structuri cu greutate moleculară de 320 000. Această moleculă formată din patru subunități este dispusă în imediata vecinătate a AchE. Natura proteică a receptorului colinergic este suplimentar demonstrată de modificările distribuției și *turnover*-ului acestei structuri generate de inhibitorii sintezei de proteine. Din aceste date rezultă un *turnover* al receptorilor colinergici de ordinul zilelor. Un aspect de mare actualitate ce rezultă din investigația farmacologică a receptorilor colinergici este generat de existența celor două tipuri de receptori colinergici: nicotinici și muscarinici și modalitatea interacției specifice a acestora cu mediatorul colinergic.

Explicația pare să fie furnizată de studiul cristalografic al Ach din care rezultă faptul că acest ester este o moleculă flexibilă, cu două grupări în planuri distincte (acetilul și respectiv colina). Rotațiile sînt posibile la nivelul legăturii ester precum și între metilenii colinei. Configurația muscarinică și nicotinică diferă tocmai în funcție de tipul și de gradul de rotație la nivelele menționate.

Configurația nicotinică a Ach cu unghiul de torsiune de 180° (antiplanar) între lanțul metilenic al colinei, pe de o parte și oxigenul legăturii esterice și carbonil pe de altă parte, iar unghiul dintre azotul cuaternar al colinei cu lanțul metilenic și oxigenul esteric de 75° (pozitiv sinclinal) [30] subliniază cele două laturi distincte ale moleculei de Ach (fig. 2), respectiv latura metil dată de C_1, O_1 și C_7 și latura carbonil configurată

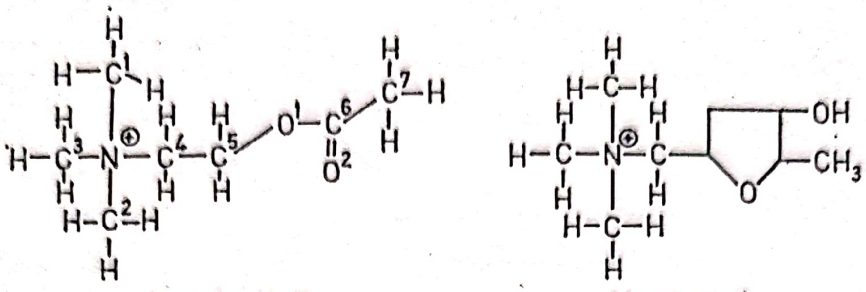


Fig. 3.2.

de C_2, C_5 și O_2. Agoniștii preponderent nicotinici au în comparație cu Ach latura carbonil păstrată și latura metil blocată, în timp ce agoniștii muscarinici au structură inversă. Un exemplu concludent de structură muscarinică în această idee este furnizat de însăși muscarina care nu conține grupul carbonil.

3.4.2. *Interacțiunea receptorului colinergic cu agoniștii și antagoniștii colinergici*

Ach și agoniștii colinergici interacționează într-o manieră specifică cu receptorul colinergic: prin modificarea conformațională a acestuia și declanșarea subsecventă a lanțului de fenomene ce generează efectul. Mărimea efectului este proporțională cu numărul de receptori activați. La o concentrație dată efectul este dependent de capacitatea de interacție a agonistului cu receptorul (afinitate) precum și de capacitatea de a genera un stimul farmacodinamic consecutiv acestei interacții (activitate intrinsecă sau eficacitate) [6]. În cazul antagoniștilor competitivi activitatea intrinsecă este nulă. Antagoniștii competitivi care în esență posedă numai afinitate sînt bine caracterizați de către constanta de disociere a complexului format de substanța respectivă cu receptorul colinergic (afinitatea este proporțională cu reciproca constantei de disociere).

Activitatea intrinsecă (eficacitatea) este proporțională cu efectul farmacodinamic maxim al substanței respective.

Modificări ale afinității se traduc prin deplasări ale curbei doză-răspuns de-a lungul axei dozelor, în timp ce modificările activității intrinsece sînt evidențiate prin creșterea sau scăderea

răspunsului maximal. În mod similar antagonismul competitiv se evidențiază prin deplasarea spre dreapta a curbei doză-răspuns fără afectarea răspunsului maximal, în timp ce antagonismul necompetitiv prin scăderea răspunsului maximal. Legarea Ach la receptor este în principal de natură ionică — între centrul anionic al receptorului și azotul cuaternar al esterului. Această legătură ionică se caracterizează prin faptul că este *p*H-dependentă. Ach competiționează cu ionii bivalenți, iar izoesterii Ach fără azot cuaternar nu interacționează cu receptorul [76]. A doua legătură importantă ar putea fi realizată de grupul ester al Ach, cu un centru activ esterofilic al receptorului [149]. Interacția Ach-receptor se soldează cu modificări conformaționale, modificări confirmate de o serie de fapte, cum ar fi: schimbarea birefringenței și eliberarea calciului din regiunea subsinaptică [36].

Două teorii încearcă să explice activarea receptorilor ca un fenomen cuantal. Paton [130] postulează că activarea este un eveniment tranzitoriu ce coincide cu momentul asocierii substanței farmacodinamic active cu receptorul. Eficacitatea substanței respective ar fi corelată cu viteza *turnover*-ului interacției cu receptorul, deci cu media ocupanței determinată de constanta de disociere a complexului respectiv.

A doua teorie se bazează pe modelul proprietăților allosterice ale enzimelor stabilit de Monod, Wyman, Changeux [119]. Astfel se admite, după Karlin și Changeux [27, 28, 88], existența a două stări conformaționale ale receptorului: „R" starea activă și „T", starea inactivă, stări care sînt în echilibru. Mecanismul de bază implicat se poate schematiza astfel:

$$\begin{array}{ccc} A + R & \underset{}{\overset{K_{AR}}{\rightleftharpoons}} & AR \\ \Big\updownarrow L & & \\ A + T & \underset{K_{AT}}{\rightleftharpoons} & AT \end{array}$$

în care K_{AR} și K_{AT} sînt constantele de disociere, iar $L = T_0/R_0$, respectiv reprezintă constanta de echilibru ale celor două stări în absența ligantului. În repaus echilibrul favorizează starea inactivă. În această idee eficacitatea unei substanțe farmacodinamic active este determinată de afinitatea sa relativă față

de cele două stări ale receptorului. Agoniștii interacționează preferențial cu forma activă a receptorului iar antagoniștii cu forma inactivă. Această interacție modifică echilibrul între cele două stări ale receptorului. Agoniștii parțiali de tipul decametoniului au afinitate pentru ambele forme ale receptorului.

3.4.3. *Desensibilizarea receptorului*

Administrarea pentru un timp relativ îndelungat a Ach sau altor agoniști la nivelul membranei subsinaptice duce, inițial, la creșterea conductanței și scăderea potențialului de membrană, urmată de revenirea lentă și paralelă a acestor parametri către valoarea de control, cu toată prezența continuă a agonistului respectiv. Acest fenomen de pierdere a sensibilității receptorului colinergic poartă denumirea de desensibilizare sau inactivare. De remarcat că substanțele curarizante antidepolarizante (*d*-tubocurarina) sau antimuscarinice (atropina) nu modifică procesul de inactivare. Din contră, agenții depolarizanți cresc viteza de inactivare. Mai mult, substanțe care nu interacționează cu receptorul colinergic ci scad numai conductanța plăcii terminale, de tipul procainei, eterului etilic, halotanului cresc viteza inactivării. Modelul propus de Taylor [160] subliniază caracterul de schimbător de cationi al suprafeței receptorului colinergic. Inițierea procesului de depolarizare ar putea fi concepută ca secundară deplasării unui ion bivalent anorganic de către două molecule monovalente cuaternare. Dacă două molecule de monomer sînt menținute împreună de un număr mic de cationi anorganici bivalenți (Ca^{2+} sau Mg^{2+}), atunci deplasarea acestei verigi de către ionii monovalenți cuaternari duce la disocierea monomerilor, cu rearanjare structurală și depolarizare. Procesul de desensibilizare este accelerat de creșterea concentrației de calciu extracelular [111]. Invers, magneziul antagonizează efectul calciului și procesul de desensibilizare. Se poate admite că acțiunea prelungită a Ach crește permeabilitatea la calciu a membranei celulare, combinația acestui cation cu locurile anionice de pe suprafața internă a membranei ducînd la scăderea permeabilității și scăderea depolarizării prin Ach. Un argument în favoarea acestei ipoteze

este creșterea prin cafeină a ratei de inactivare produsă de către carbaminoilcolină. Ansamblul datelor de farmacologie privind procesul de inactivare pledează pentru interpretarea fenomenului ca o consecință a modificării conductanței plăcii terminale și mai puțin a receptorului colinergic.

3.5. Hidroliza enzimatică a acetilcolinei

3.5.1. *Colin-esterazele*

3.5.1.1. Distribuție și localizare

Pe baza datelor biochimice și histochimice, se admite că AchE este localizată în membranele celulare excitabile. AchE este preferențial localizată la nivelul plăcii terminale, în plicaturile acesteia. În axon sau în regiunea musculară se găsește o cantitate redusă de AchE, fiind estimată la aproximativ 4000 de molecule pe μ^2 de suprafață membranară postjoncțională. O densitate ridicată a AchE a fost evidențiată în ganglionii vegetativi, cu localizare în terminațiile fibrelor preganglionare. La nivelul ganglionilor se poate face distincție între fracțiunile de AchE intra- și extraganglionare [113] cu ajutorul inhibitorilor cu grade diferite de liposolubilitate. Ca și în cazul altor sinapse, fracțiunea externă este considerată AchE funcțională, în timp ce fracțiunea internă drept AchE de rezervă. În sistemul nervos central acetilcolin-esteraza a fost evidențiată în diverse structuri, inclusiv în acelea în care nu există dovezi de transmisie colinergică. O largă distribuție a enzimei a fost evidențiată, la diverse specii, în cortexul cerebral în primul rînd, precum și în trunchiul cerebral, în hipotalamus, în cerebel, în substanța reticulată etc. Cercetările histochimice efectuate de Koelle și col. [97] au pus în evidență localizarea AchE atît în membranele presinaptice cît și postsinaptice. Alături de acetilcolin-esterază este pusă în evidență și pseudocolin-esteraza care este localizată predominent postsinaptic.

S-a stabilit prin tehnici electroforetice că AchE și butirilchE se compun din mai multe izoenzime [13, 157]. O problemă majoră în studiul AchE cerebrale este dificultatea solubilizării

ei, datorită legării de componentele membranare. Prin simplă omogenizare și centrifugare Chan și col. [26] au putut solubiliza AchE cerebrală din nucleul caudat de bovine în proporție importantă și după purificare au putut evidenția două forme majore ale enzimei. Autorii subliniază o mare stabilitate a enzimei, iar cele două forme diferite au greutăți de respectiv 291 000 și 430 000.

Distribuția AchE la nivelul plăcii motorii, în ganglionii vegetativi, sistemul nervos central, în mușchii netezi sau în alte țesuturi are în anumite limite o justificare funcțională în contextul concepției transmisiei colinergice a impulsului nervos la aceste nivele. Cantitatea mare de AchE eritrocitară și pseudochE au generat o serie de ipoteze, privind funcționalitatea acestor enzime la aceste nivele.

În ceea ce privește funcționalitatea AchE eritrocitare, considerăm că aceasta face parte din ansamblul adaptativ de localizare funcțională, specifică, a eliberării Ach la nivel sinaptic și limitarea difuzibilității ei, constituind un al doilea sistem tampon, de siguranță, în raport cu AchE localizată sinaptic. Acest punct de vedere asupra funcționalității AchE eritrocitare pare plauzibil în raport cu alte redundanțe morfo-funcționale interpretate și ele ca adaptări ale organismului la o gamă largă de solicitări. În favoarea acestei ipoteze pledează și sensul evoluției colinesterazelor în serie filogenetică, concordanța modificărilor colinesterazelor diferit localizate indusă prin mijloace farmacodinamice, pragul ridicat al declanșării fenomenelor toxice prin inhibitori specifici (inhibiția peste 50% din valoarea normală), precum și posibilitatea estimării gradului de intoxicație cu anticolin-esterazice organo-fosforice prin determinarea inhibiției AchE eritrocitare.

3.5.1.2. Structură

În funcție de modalitatea de extracție și de gradul de purificare, precum și de specia de la care provine și țesutul prelucrat, au fost raportate diferite greutăți moleculare ale AchE. Sînt astfel comunicate greutăți moleculare cuprinse între 160 000 și 4 000 000. AchE din electroplax are o greutate moleculară de 260 000, este compusă din patru subunități și are aparent

doi centri activi pe moleculă. PseudochE din serul uman într-un stadiu foarte avansat de purificare are o greutate moleculară de aproximativ 300 000.

S-a stabilit de asemenea compoziția și secvența aminoacizilor din centrii activi, atît pentru AchE, cît și pentru pseudochE. Studiul proprietăților moleculare a permis separarea în două subunități a moleculei de AchE, fiecare de 120 000 și prin prelucrare suplimentară în 4 subunități egale [65, 108]. Aceste date au permis lui Leuzinger [109] concluzia că AchE este un dimer, cu fiecare protomer alcătuit din două lanțuri polipeptidice neidentice, avînd fiecare o greutate moleculară de aproximativ 64 000.

Changeaux și col. [28], într-un studiu electrono-microscopic al enzimei pure, observă unități globulare cu un diametru de 50 ± 10Å, cu o greutate moleculară estimată în jur de 50 000. Aceste structuri ar fi după autorii citați subunitățile enzimatice. Olsen și col. [128], tot într-un studiu electrono-microscopic, arată însă că molecula de AchE este un dimer și nu un tetramer. Acest dimer morfologic reprezintă molecula activă de AchE cu fiecare unitate globulară conținînd două lanțuri polipeptidice neidentice. Distanța dintre centrii celor două unități este apreciată la aproximativ 60Å și greutatea moleculară la 260 000.

Centrii activi. Pe baza analizei vitezei de hidroliză a acetatului de dimetilaminoetil care este favorizată în mediu acid s-a tras concluzia că hidroliza cationului este mai rapidă, ceea ce indică prezența unui centru anionic.

AchE posedă un centru anionic, iar pseudochE posedă de asemenea un centru neesterazic de tip diferit. Ambele enzime posedă însă cîte un centru esterazic. Forțele predominente implicate în funcționalitatea centrilor neesterazici sînt de tip coulombic pentru AchE și de tip van der Waals pentru pseudochE. Centrii neesterazici explică de ce colinesterazele sînt mai sensibile la sărurile cuaternare de amoniu decît alte esteraze. Această trăsătură — afinitatea pentru structurile cationice (substraturi sau inhibitori) este caracteristica cea mai tipică a acestei enzime.

Există dovezi că centrul esterazic al colinesterazelor are în structura sa serina, degradarea enzimei inhibate cu DFP ^{32} pune în libertate *O*- serin fosfat- P^{32} [146].

În ceea ce privește prezența histidinei, dovezile prezenței în structura centrului neesterazic a acesteia sînt indirecte. Imidazolul histidinei și serina sînt considerate grupările bazice

majore ale centrului esterazic al colin-esterazei. Grupul acid al acestui centru este hidroxilul tirozinei.

Se admite de asemenea prezența unui acid dicarboxilic în centrul anionic, care ar fi purtătorul sarcinii negative de la acest nivel.

Brestkin și col. [86] consideră că centrii activi — esterazic și anionic — sînt foarte asemănători pentru AchE și pentru pseudochE. Diferențele cunoscute între cele două enzime sînt generate nu de structura diferită a centrilor activi ci de ariile structural diferite ce înconjură acești centri.

Interacția dintre capul cationic al Ach și centrul anionic al AchE se realizează nu numai prin intermediul forțelor coulombice ci și prin sorbție hidrofobică (interacție hidrofobică) [10, 86]. Interacția hidrofobică în cazul în speță, ca și în alte situații similare, favorizează formarea complexului enzimă-substrat prin intervenția mediului hidrofilic care împinge părțile hidrofobe ale substanței dizolvate către regiunile hidrofobe ale enzimei. În apropierea centrului esterazic al AchE există probabil doar o singură zonă hidrofobă cu proprietăți de complementaritate cu radicalul izohexil.

Fig. 3.3. Dispunerea ariilor hidrofobe (E,A_1 și A_2) pe suprafața activă a AchE, după [86].

3.5.1.3. Izoenzime

Diverși autori au prezentat dovezi privind existența unor izoenzime ale AchE din sistemul nervos central [13, 26, 157] sau din eritrocite [32]. În *Electroforus* au fost găsite patru izoenzime ale AchE și două ale pseudochE. Cele două izoenzime ale AchE eritrocitare umane evidențiate electroforetic sau cromatografic diferă ca sarcină moleculară dar nu ca greutate moleculară [32]. Recent au fost evidențiate cromatografic trei zone ale AchE eritrocitare umane cu greutăți moleculare diferite [178].

Existența izoenzimelor pseudochE a fost demonstrată în corelație cu modificările sensibilității clinice la succinilcolină [85]. Au fost separate electroforetic șapte fracțiuni din serul uman, aproape 80% din activitatea colin-esterazei fiind regăsită într-o singură izoenzimă [83, 103].

Răspunsul clinic anormal prelungit la succinilcolină a fost explicat ca o anomalie genetică, respectiv determinat de prezența unei pseudochE atipice, definită prin rezistența la inhibiția cu dibucaină [85]. Enzima dibucain-rezistentă are eficiență scăzută în hidrolizarea succinilcolinei.

O altă variantă genetică a fost pusă în evidență prin folosirea fluorurii de sodiu ca inhibitor, respectiv — izoenzima rezistentă la fluorură [72].

Succinilcolina și alte substanțe cu o oarecare activitate anticolin-esterazică interacționează diferit cu enzimele uzuale și cu cele atipice. Se obțin curbe de inhibiție net diferite la succinilcolină cu șase variante de colinesteraze studiate [95, 96].

3.5.1.4. Hidroliza acetilcolinei

Conceptul actual al mediației colinergice acordă un loc esențial funcției hidrolitice a acetilcolin-esterazei care controlează durata interacțiunii Ach-receptor, permițînd repetarea în limitele de timp cunoscute a ciclului: stimul — eliberare de Ach — interacțiune cu receptorul colinergic — hidroliza subsecventă a Ach — refacerea funcțională a receptorului etc.

Substratul natural, specific, al AchE este Ach, deși alți esteri de colină cum sînt butirilcolina, propionilcolina, sînt supuși hidrolizei enzimatice dar cu o rată inferioară a Ach. Suplimentar, AchE prezintă inhibiție de substrat la concentrații ale Ach mai mari de $3 \cdot 10^{-3}$ M. PseudochE nu prezintă această caracteristică. Mecanismul hidrolizei enzimatice a Ach a fost propus inițial de Wilson și col. [173, 174].

Mecanismul propus se desfășoară în două etape — în prima se produce acetilarea enzimei și eliminarea simultană a colinei urmată în etapa a doua de deacilarea enzimei.

Oxigenul serinei funcționează ca grupare nucleofilică, proprietate amplificată prin formarea unei legături de H cu azotul din ciclul imidazolic al histidinei. Etapa de formare a enzimei acetilate controlează viteza de desfășurare a procesului de hidro-

Scanned with OKEN Scanner

liză catalitică a Ach. Carbonul electrofilic al grupului ester formează cu gruparea bazică nucleofilă a centrului esterazic o legătură electrostatică. În esență are loc următoarea reacție:

$$E + S \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{K_{+2}} E\text{-acil} + P_1$$

$$E\text{-acil} + H_2O \xrightarrow{K_{+3}} E + P_2.$$

Viteza de hidroliză este:

$$v = \frac{K.E.S.}{S + K_m},$$

în care

$$K = \frac{K_{+2}}{1 + \frac{K_{+2}}{K_{+3}}}$$

E = concentrație inițială a enzimei
S = concentrație inițială a substratului

$$K_m = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}} \Big/ \left(1 + \frac{K_{+2}}{K_{+3}}\right).$$

3.5.1.5. Substanțe care potențează activitatea AchE

Anumiți compuși cuaternari de amoniu și ioni anorganici potențează activitatea hidrolitică a acetilcolin-esterazei [141, 142, 143].

Se admite că această potențare se realizează prin creșterea ratei de acetilare în procesul de hidroliză. Astfel, în prezența unor compuși de tipul tetraetilamoniu (TEA), concentrația optimală de substrat se deplasează spre concentrații mai mari iar rata de hidroliză este mai mare față de control. În prezența unor concentrații mici de Ach, TEA inhibă hidroliza enzimatică a acesteia dar viteza maximă de hidroliză crește de 1,6 ori față de control.

Studiind acțiunea unei serii de derivați cuaternari de amoniu asupra hidrolizei enzimatice a Ach sau a fenilacetatului se calculează energia liberă de legare a acestor compuși la AchE.

$$\Delta F_i = -RTL_n \frac{1}{K_i}.$$

TABELUL II

Variația energiei libere de legătură (ΔFi) a unor compuși cu AChE în raport cu efectele asupra deacetilării (după [143]).

Compusul	*ΔFi observată*	*ΔFi calculată*	*ΔFi observată (enzima liberă)*	*ΔFi calculată-observată (enzima acetilată)*	*Efectul asupra deacetilării*
TMA	−4940				0
TEA	−5250	−7820	−2570	−2170	+++
TPA	−7180	−8170	− 990	− 730	−

0 = Absența efectului; + = Accelerarea deacetilării; − = Blocarea deacetilării.

Din tabelul II rezultă o diferență între energia liberă de legătură observată și calculată pentru compușii cuaternari cu enzima liberă sau acetilată. Acest fapt sugerează că forțele ce determină interacția enzimei cu TMA, TEA sau TPA nu sînt exclusiv hidrofobe ci intervin și alți factori. TEA este un potențator bun al activității acetilcolin-esterazei, în timp ce TPA (tetrapropil amoniu) nu posedă această acțiune, fiind un inhibitor al reacției de deacetilare.

Rezultă din tabel că variația ΔF_i este diferită la potențatori în raport cu cei care nu modifică sau inhibă deacetilarea.

În absența ionilor, AchE eritrocitară umană purificată prezintă o activare a procesului de hidroliză a Ach, interpretat ca o activare enzimatică, secundară legării unei a doua molecule de substrat la un centru periferic specific al enzimei.

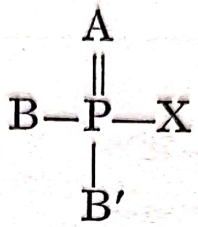
În prezența a diferite concentrații de NaCl, KCl, MgCl și $CaCl_2$, concentrația de substrat care produce inhibiția AchE crește cu puterea ionică a mediului [52].

Cationii monovalenți și bivalenți cu diferite forțe ionice influențează diferit parametrii cinetici K_m și V_{max} ai AchE. Este posibil ca efectele cationilor astfel observate să fie o interacție ion-dependentă cu centrul esterazic sau allosteric al AchE.

3.5.2. *Inhibiția colin-esterazelor*

3.5.2.1. Fosforilarea colin-esterazelor

Interacția dintre un ester organofosforic și colin-esteraze, la nivelul hidroxilului serinei, duce la inactivarea acestui grup de enzime. Formula generală a unui inhibitor organofosforic este:



în care A = O; S

X = grupare acidă a moleculei (F, nitril, p-nitrofenoxi etc.)

B, B′ } grupări bazice (alchil, alcoxi, amino etc.)

Studiul corelațiilor dintre structura compușilor organofosforici și activitatea anticolin-esterazică a evidențiat faptul că această activitate depinde de reactivitatea esterului [66]. Pentru fenildietilfosfați, activitatea AchE este corelată cu capacitatea substituentului de a ceda electroni (constanta sigma Hammet). Există o corelație liniară între această capacitate și log. concentrației, I_{50} (concentrația molară care produce o inhibiție de 50% a enzimei).

Proprietățile sterice ale compușilor organofosforici au importanță semnificativă în îndeplinirea activității inhibitorii.

O serie de esteri ciclici, de exemplu, de tip *p*-nitrofenoxi-1, 3, 2-dioxafosforinan-2-oxid, cu toată similitudinea de structură cu paraoxonul, au activitate antichE de aproximativ 1/100 000 din activitatea acestuia din urmă. Capacitatea de a se hidroliza a acestor esteri este de același ordin de mărime ca și la paraoxon, admițîndu-se că scăderea activității inhibitorii este consecutivă unor efecte sterice. Stereospecificitatea inhibiției AchE a fost demonstrată și cu izomeri cis și trans ai unor compuși organofosforici.

Enzima fosforilată rezultată din interacţia AchE cu esterul organofosforic este o formă stabilă. Reacţia poate fi schematizată astfel:

$$EH + AB \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} EHAB \xrightarrow{K_{+2}} EA + BH$$

EH — enzimă liberă
AB — ester organofosforic
EHAB — complexul enzimă — inhibitor
EA — enzimă fosforilată
BH — grup scindat din molecula inhibitorului *(leaving group)*.

Adăugarea de substrat scade net viteza de reacţie a esterului organofosforic cu AchE, ceea ce permite concluzia că inhibitorul reacţionează cu centrul esterazic al enzimei. Suplimentar pledează pentru acest lucru asemănarea structurală dintre inhibitorii puternici şi substratul natural, distanţa dintre atomul central din substituent şi atomul de fosfor electrofilic fiind foarte apropiată de distanţa dintre azotul cuaternar şi carbonilul Ach.

Se presupune că inhibitorul organofosforic interacţionează atît cu enzima liberă cît şi cu complexul enzimă-substrat sau cu enzima acetilată [102, 167].

Se admite în general similitudinea dintre reacţia inhibitorului cu enzima, cu cea dintre aceasta din urmă şi substrat. După modelul propus de Krupka [101, 102], centrul anionic care atrage trimetilamoniul substratului interacţionează cu grupul substituent din compusul organofosforic. Fosforilarea

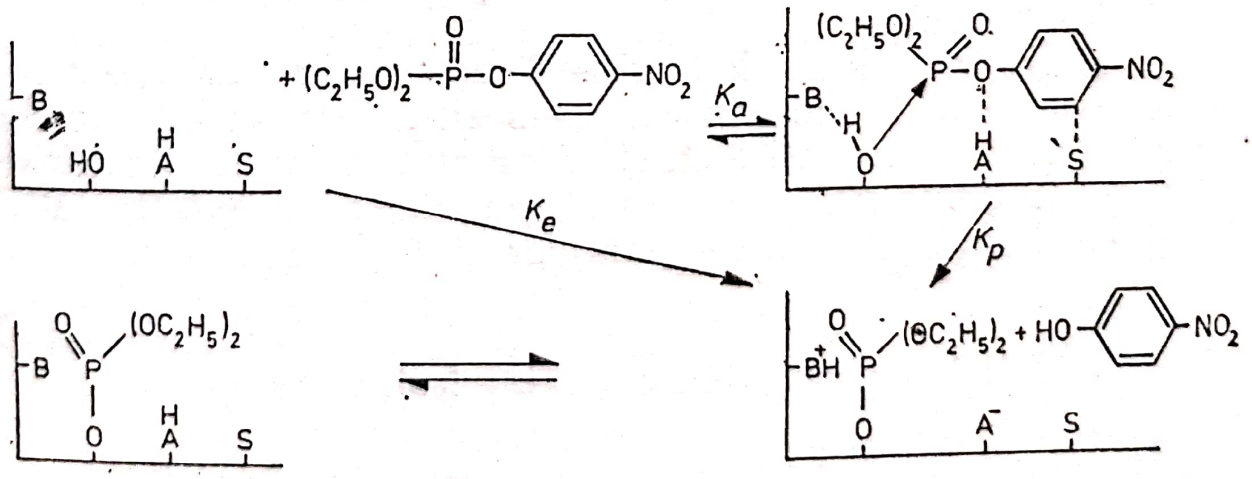


Fig. 3.4. Interacţia unui ester organofosforic cu acetilcolin-esteraza, după [66]; B — grupare bazică; OH — hidroxilul serinei; AH — grupare acidă; S — centrul anionic.

se realizează la nivelul hidroxilului serinei, reacția fiind catalizată de grupările bazice și acide ale centrului activ. Enzima fosforilată este inactivă.

Ceea ce diferă însă net este valoarea constantelor de reacție și mai ales a uneia dintre acestea, respectiv hidroliza produsului (enzima acetilată sau fosforilată).

Astfel Ach comportîndu-se ca substrat este hidrolizată în cantitate de 300 000 molecule/min. de către o moleculă de enzimă în timp ce dimetilfosfatul de exemplu este hidrolizat în cantitate de numai 0,008 molecule pe minut.
La concentrații de Ach mai mici de $5 \cdot 10^{-3}$ M, substanța organofosforică reacționează preferențial cu enzima liberă, în timp ce la concentrații mai mari, inhibitorul reacționează atît cu enzima liberă cît și cu enzima cuplată cu substratul la nivelul grupării acide a centrului esterazic (apărut ca urmare a excesului de substrat). Nu reacționează cu complexul format inițial între enzimă și substrat la nivelul grupării bazice a centrului esterazic.

3.5.2.2. Reactivarea spontană

Fosforilarea colin-esterazelor poate fi considerată în anumite limite un fenomen ireversibil. Este bine cunoscut însă procesul de reactivare spontană, rezultat probabil al interacției enzimei fosforilate cu apa. Reactivarea spontană a colin-esterazelor fosforilate este dependentă pe de o parte de tipul colin-esterazei implicate, iar pe de altă parte de particularitățile structurale ale inhibitorului.

AchE eritrocitară de la mamifere se reactivează spontan cu un semitimp de aproximativ 2—3 zile. Variația este corelată atît cu sursa enzimatică cît și cu structura inhibitorului. Toxicitatea inhibitorilor organo-fosforici depinde, printre altele, și de stabilitatea colin-esterazelor fosforilate.

3.5.2.3. Îmbătrînirea colin-esterazei fosforilate

În fapt, enzima fosforilată poate urma două căi: hidroliza, respectiv reactivarea spontană a colin-esterazei, și îmbătrînirea *(ageing* sau *aging)* a enzimei inhibate.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL III

Reactivarea spontană a colin-esterazelor fosforilate în funcție de structura inhibitorului

Formula generală a inhibitorului $(RO)_2P(O)X$			
Sursa de enzimă	*Semitimpul de reactivare*	*Structura substituentului R*	*Referința*
Ser de șobolan	5 ore	CH_3-CH_2-	[37]
Eritrocite de șobolan	1,8 zile		[164]
Ser uman	30 zile		[38]
Eritrocite umane	2,4 zile		[22]
Eritrocite de șobolan	21 minute	$ClCH_2-CH_2-$	[106]
Ser uman	20 minute		[137]
Eritrocite de șobolan	2 ore	CH_3-	[164]

Procesul de îmbătrînire este o conversie a enzimei fosforilate într-o formă nereactivabilă (spontan sau prin agenți nucleofilici), care implică eliberarea unui grup alchil sau alcoxi din vecinătatea fosforului într-o reacție de ordinul întîi:

$$R_1O(R_2)P(O)O\text{-Enzimă} \rightarrow {}^{-}O(R_2)P(O)O-\text{Enzimă} + R_1^{+} \begin{cases} \nearrow \text{alcool} \\ \searrow \text{alchenă} \end{cases}$$

$$R_1 = \text{alchil}$$

$$R_2 = \text{alchil, alcoxi}$$

Îmbătrînirea colin-esterazelor fosforilate poate avea loc atît *in vitro* cît și *in vivo*. Se consideră că îmbătrînirea presupune ruperea legăturii C—O din grupul alcoxi [12, 92], ca urmare a formării unei legături de hidrogen a grupării protonate cu atomul de oxigen legat de fosfor. Această legătură de hidrogen ar polariza legătura C—O, facilitîndu-i fisiunea prin formarea unui ion carboniu. Se admite de asemenea că grupul alcoxi poate fi înlăturat prin atac nucleofilic la atomul de fosfor, cu ruperea legăturii P—O [105].

TABELUL IV

Îmbătrînirea colin-esterazelor fosforilate

Sursa enzimatică	*Inhibitor*	*Semitimpul de îmbătrînire*	*Referința*
Eritrocite umane	DFP	4,4 ore	(77)
	TEPP	39 ore	(77)
	Metil fluoro-fosforilcolina	< 10 minute	(59)
	Soman	2,2 minute	(62)
Eritrocite de bovină	DFP	4,6 minute	(77)
	TEPP	39 ore	(77)

Se consideră că îmbătrînirea [14] este lentă cînd grupul alchil este un alcool primar și mult mai rapidă dacă grupul alchil este un alcool secundar sau ciclic. Mai mult decît atît, s-a găsit că procesul de îmbătrînire prezintă diferențe marcate, în funcție de stereostructura inhibitorului. Viteza de îmbătrînire a colin-esterazelor fosforilate crește cu scăderea *p*H și prin adiție de tiouree.

S-a evidențiat [92] o bună corelație între constantele de viteză ale procesului de îmbătrînire și curbele de ionizare ale grupului disociabil pentru zona de *p*H cuprinsă între 4,75 și 9 pentru colin-esteraza fosforilată și între 4,5 și 7,5 pentru acetil-colin-esteraza fosforilată. Datele experimentale arată că gradul de protonare [77] a unui grup disociabil, la aceste valori ale *p*H, guvernează viteza îmbătrînirii. Constanta de viteză a procesului de îmbătrînire corectată în funcție de gradul de protonare reprezintă constanta de viteză maximă, independentă de *p*H.

3.5.2.4. Reactivarea prin atac nucleofilic

Observația că AchE fosforilată poate fi reactivată prin colină a premers utilizării hidroxilaminei și acizilor hidroxamici în acest scop [173, 174, 175]. Datele experimentale ulterioare au evidențiat faptul că în marea majoritate cei mai activi reactivatori ai colin-esterazelor fosforilate sînt derivații cuaternari

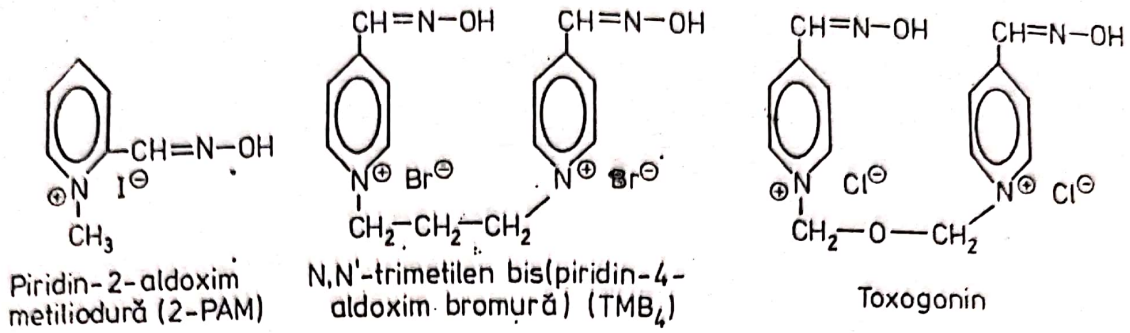
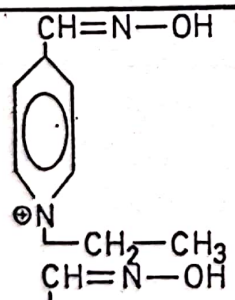
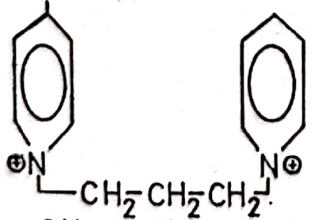
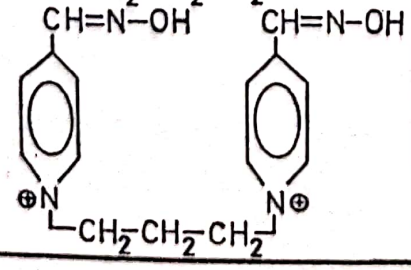


Fig. 3.5. Structurile chimice ale unor cunoscuți reactivatori de colinesteraze.

de amoniu cu grupare oximică (=N—O⁻) ca funcție reactivatoare. Distanța dintre cele două grupări trebuie să fie aproximativ egală cu distanța dintre centrul anionic și esterazic al enzimei. Printre cei mai eficienți compuși reactivatori ai colinesterazelor fosforilate sînt: 2-PAM, TMB_4 și toxogonina (fig. 3.5) [58, 62, 63, 87].

TABELUL V

Reactivarea, constanta de disociere și ionizarea TMB_4 și oximelor înrudite (După [15]).

Structura reactivatorului	*Viteza de reacție relativă* (2-PAM = 1)	pK_a	*Ionizare* % La $pH = 7,4$
	1/33	8,2	6%
	8	8	20%
	22	$pK_{a_1} = 7,78$ $pK_{a_2} = 8,61$	29,5% 5,8%

Procesul de reactivare poate fi tratat cinetic similar cu reacția dintre substrat și enzimă:

$$EI + R \underset{K_{-1}}{\overset{K_{+1}}{\rightleftharpoons}} EIR \xrightarrow{K_{+2}} E + RI,$$

EI = enzimă fosforilată

R = reactivator

Prin analogie, K_m este considerat drept:

$$K_r = \frac{[EI] \cdot [R]}{[EIR]} = \frac{K_{-1} + K_{+2}}{K_{+1}}$$

După formarea complexului EIR, grupul nucleofilic al reactivatorului reacționează cu fosforul electrofilic al inhibitorului și astfel enzima este eliberată. Rezultă că reactivarea este dependentă de intensitatea atacului nucleofilic al agentului reactivator și de puterea atracției electrofilice a fosforului. Procesul implică formarea unui complex între enzima fosforilată și reactivator prin legarea oximei cuaternare la nivelul centrului anionic al enzimei. Acest fapt a fost evidențiat prin competiția manifestată de colină, $-NH_4^+$ sau Ach, față de procesul de reactivare [70, 71].

Un bun reactivator trebuie să aibă valoarea pK_a scăzută la pH fiziologic iar forma disociată să posede o marcată proprietate nucleofilică. La această valoare a pH-ului (7,4), proporția de anioni oximici activi este mai mare pentru bispiridinoxime (tabelul V) decît pentru corespondenții monoaldoximici.

3.5.2.5. Carbamilarea colin-esterazelor

Interacția dintre carbamați și AchE mimează hidroliza uzuală a Ach.

$$E + IX \underset{K_{-1}}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} EIX \xrightarrow[\searrow X]{K_2} EI \xrightarrow{K_3} E + P; \quad K_a = K - 1/K_1$$

E = AchE liberă

IX = Esterul carbamic

X = Grupul care este îndepărtat

EIX = Complexul enzimă-inhibitor

EI = Enzima carbamilată

P = Acidul alchilcarbamic

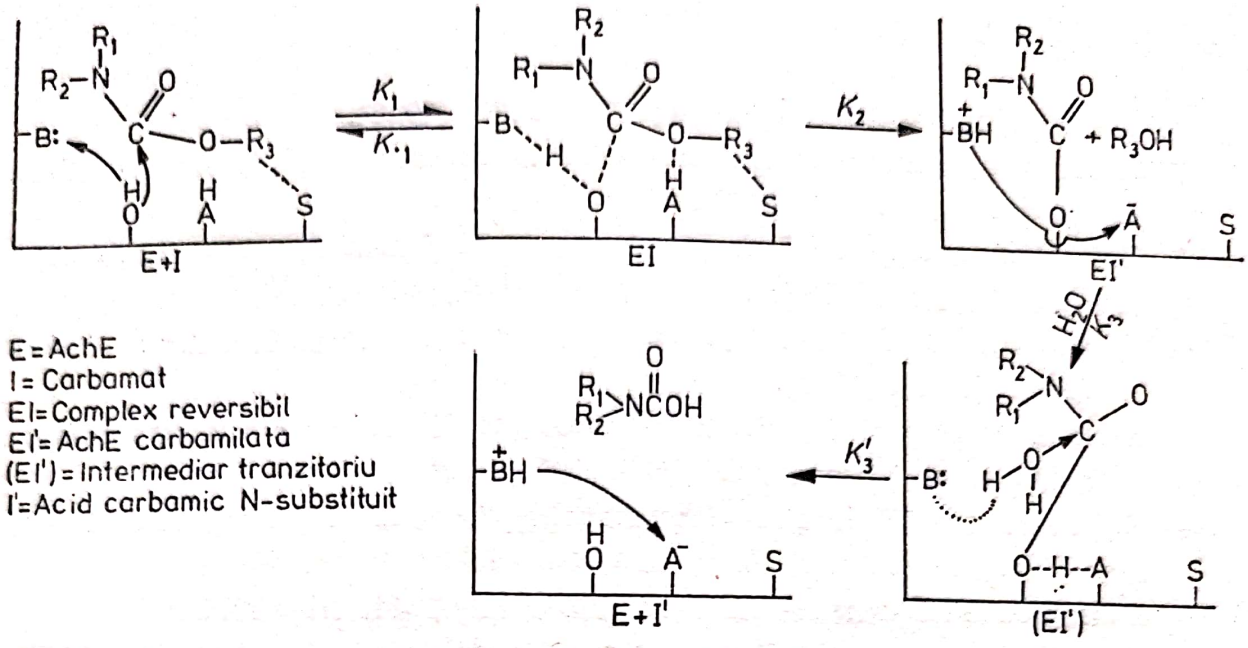


Fig. 3.6. Model pentru interacția inhibitorilor carbamici cu acetilcolin-esteraza, după [50]; E — AchE; I — carbamat; EI — complex reversibil; EI′ — AchE carbamilată; I′ — acid carbamic *N* — substituit.

Deosebirea esențială este dată de creșterea stabilității AchE carbamilate cu un factor de 10^6, în comparație cu AchE acetilată. La nivelul centrului esterazic care conține —OH-ul serinei încorporată în peptid în secvența: glicil-aspartil-seril-glicin și care formează o legătură covalentă cu carbonul electrofilic al carbamatului respectiv, Reed și Fukuto [50, 51] propun mecanismul prezentat în fig. 3.6.

Carbamilarea hidroxilului serinei este rezultatul interacțiunii dintre protonul grupului acid și carbonul electrofilic al grupării carbonil. Se admite că și procesul invers de decarbamilare a AchE se realizează într-o manieră similară cu deacetilarea enzimei [50, 51].

Reactivarea prin agenți nucleofilici a ChE carbamilate este îndoielnică [50], deși numeroase date demonstrează creșterea decarbamilării prin oxime cu scăderea consecutivă a toxicității inhibitorilor carbamici [126, 145, 177].

Efectele beneficiale ale oximelor în intoxicația cu compuși carbamici sînt probabil datorate nu atît creșterii vitezei de decarbamilare a colin-esterazelor ci altor proprietăți ale oximelor, cum sînt cele anticolinergice etc.

CAPITOLUL 4

SISTEMUL ADRENERGIC

4.1. Sinteza catecolaminelor

Disponibilitatea catecolaminelor (CA) la diferite nivele funcționale unde realizează funcții de mediatori chimici sau funcții hormonale este dependentă de biosinteză, proces care, la rîndul său, fiind multisecvențial, variază sub influența unor diverși factori endogeni și exogeni (fig. 4.1). Se admite că, prima etapă în secvența de reacții ce duce la sinteza de noradrenalină este conversia enzimatică a tirozinei în dopa. În această reacție, tirozina constituie substratul tirozinhidroxilazei, aceasta din

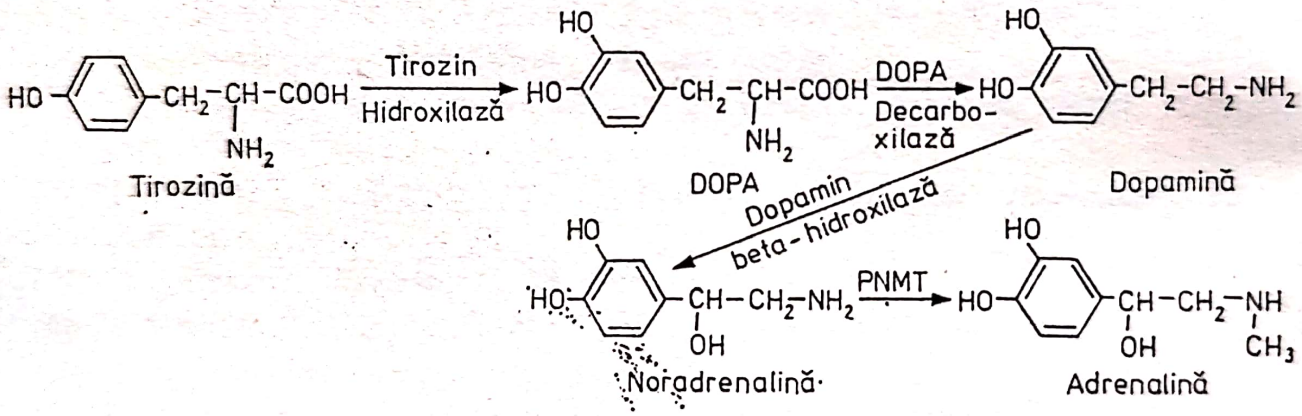


Fig. 4.1. Biosinteza catecolaminelor

urmă avînd drept cofactori dihidropteridina și fierul bivalent. Tirozina care se formează în diferite țesuturi din fenilalanină este disponibilă în țesuturi și în lichidele organismului în concentrație de aproximativ 10^{-4} M, ajungînd în structurile adrenergice printr-un mecanism de transport mai mult sau mai puțin specific, incomplet caracterizat [134; 135; 139; 140]. Întrucît procesul de hidroxilare al tirozinei la dopa este mai lent decît reacțiile următoare, această etapă este limitantă de viteză. Stimularea eliberării de CA prin exercițiu fizic asociată cu un inhibitor al tirozin-hidroxilazei duce la depleția rapidă a CA [49].

Însăşi stimularea prin exerciţiu a sintezei de CA se realizează prin activarea tirozin-hidroxilazei şi nu prin creşterea concentraţiei enzimei [135]. Pe de altă parte, tirozin-hidroxilaza este inhibată printr un mecanism *feed-back* negativ de către concentraţia produsului final, respectiv de concentraţia de noradrenalină (NA). Creşterea nivelului tisular de NA prin tratament cu inhibitori de monoamin-oxidază (MAO) duce la scăderea conversiei tirozinei (116).

Etapa următoare în biosinteza CA este catalizată de *L*-dopa-decarboxilază şi constă în conversia *L*-dopa în dopamină. Enzima este sensibilă la cianuri şi necesită drept cofactor piridoxalfosfatul. Dopa-decarboxilaza nu are o specificitate de substrat foarte ridicată ceea ce face ca şi alte structuri de tipul meta- sau orto-tirozinei, alfa-metil dopa sau alfa metil-meta tirozinei (alfa-MMT) să fie decarboxilate, proces cu implicaţii farmacologice importante.

Introducerea unui grup hidroxi în poziţia β a lanţului lateral al dopaminei şi geneza noradrenalinei este catalizată de dopamin-β-hidroxilază, enzimă asociată cu granulele de depozit. Dopamin-β-hidroxilaza este o cupru enzimă şi necesită drept cofactori acidul ascorbic şi acidul fumaric. Dopamina, după toate probabilităţile, este captată întîi în granulele de stocaj după care este β-hidroxilată.

Metilarea noradrenalinei se realizează sub controlul catalitic al feniletanolamin-*N*-metil-transferazei (PNMT), în prezenţa *S*-adenozilmetioninei care serveşte drept coreactant al NA, respectiv donor al grupului metil [7; 8].PNMT are concentraţia cea mai ridicată în medulosuprarenală, în fond sediul principal al sintezei adrenalinei.

În procesul de biosinteză al CA există trei locuri [40] unde inhibitorii endogeni pot modifica viteza întregului proces. În afară de inhibiţia de tip *feed-back* a tirozin-hidroxilazei de către NA s-a evidenţiat prezenţa unui inhibitor în medulosuprarenală care este inactivat de către agenţii blocanţi ai grupărilor sulfhidril de tipul *N*-etilmaleimidei [31; 93]. Al treilea loc de reglare prin inhibitori ar fi etapa de metilare a NA, respectiv prin inhibarea PNMT de către produşii rezultaţi din reacţie, respectiv adrenalina şi *S*-adenozil homocisteina.

Sinteza CA este controlată de factori multipli endogeni printre care de o deosebită importanţă sînt tonusul sistemului simpatic şi exerciţiul fizic, controlul hormonal al sintezei CA la nivelul medulosuprarenalei prin intermediul ACTH şi gluco-

Scanned with OKEN Scanner

corticoizilor sau de factori exogeni ca expunerea la frig, stressul de diferite tipuri, expunerea la radiații ionizante, substanțe farmacodinamice ce cresc eliberarea de CA, inhibitori sau activatori ai enzimelor implicate în sinteză etc.

4.1.1. *Inhibitori ai sintezei catecolaminelor*

4.1.1.1. Inhibitorii tirozin-hidroxilazei

Un inhibitor semnificativ al tirozin-hidroxilazei este alfa-metiltirozina care poate produce scăderi nete ale NA [116]. Efecte similare cu alfa-metiltirozina produc dimetil esterul său precum și derivații 3-halo-alfa-metiltirozinei [25; 48]. O inhibiție mai slabă a fost observată la dopacetamidă și derivați [24] precum și în prezența catecolilor [47], alfa-metil-5-hidroxitriptofanului [142], agenților chelatori [123] etc.

4.1.1.2. Inhibitorii dopa-decarboxilazei

Administrarea de alfa-metildopa sau alfa-MMT duce la scăderea marcată a NA tisulare, realizată printr-un marcat efect inhibitor al dopa-decarboxilazei [115]. Este foarte probabil că în realizarea efectului de scădere a NA să intervină și substituția acesteia prin falși transmițători rezultați din decarboxilarea și β-hidroxilarea inhibitorilor menționați, ceea ce contribuie la realizarea efectelor terapeutice cunoscute în hipertensiune. Un argument în favoarea acestei afirmații este furnizat de inhibiția marcată produsă de derivații hidrazinici de tipul *N*-metil-N-(-3-hidroxibenzil)-hidrazina care au efecte reduse asupra conținutului de CA și contracarează efectul hipotensiv al alfa-metildopei și alfa-MMT [27; 134].

4.1.1.3. Inhibitorii dopamin-β-hidroxilazei

Inhibitorii dopamin-β-hidroxilazei produc scăderea CA în medulosuprarenală și în alte țesuturi. Printre inhibitorii semnificativi ai conversiei enzimatice a dopaminei în noradrenalină

menționăm: feniletilamina, hidroxibenziloxiamina, ditiocarbamații, tioureea și compușii înrudiți și alți agenți chelatori.

Disulfiramul din care se formează în prezența acidului ascorbic compusul activ dietilditiocarbamatul inhibă dopamin-β-hidroxilaza probabil prin chelarea unui activator metalic [46].

4.1.1.4. Inhibitorii feniletanolamin-*N*-metil-transferazei (PNMT)

Din această categorie fac parte 3,4-dicloramfetamina [41], aminobenzimidazolii, benzilaminele halogenate [40]. Acești agenți reduc sinteza adrenalinei atît *in vitro* cît și *in vivo*, în medulosuprarenala diferitelor specii de animale. Dată fiind prezența A și PNMT și la nivelul altor țesuturi, inclusiv în sistemul nervos central, studiul suplimentar al inhibitorilor PNMT ar putea furniza date farmacologice și farmacoterapeutice importante.

4.2. **Captarea CA**

Un alt proces fiziologic esențial pentru funcția adrenergică este captarea catecolaminelor sintetizate, eliberate fiziologic sau administrate prin metode farmacologice. Acest proces se realizează în neuronii adrenergici, în structurile nervoase adrenergice periferice, în granulele de depozit, în diferite celule efectorii. Procesul de captare reprezintă, printre altele, o modalitate esențială de inactivare a catecolaminelor circulante (fig. 4.2).

Catecolaminele, prin structura lor polară, presupun, în contextul procesului de captare, mecanisme de transport transmembranar cu un anumit grad de specificitate.

Au putut fi identificate și caracterizate mai multe modalități de captare [63], în funcție de structurile implicate în acest proces și de particularitățile procesului însăși. Astfel CA pot fi transportate din spațiul extracelular prin membrana axonală a nervilor adrenergici în axoplasmă unde sînt supuse unui alt proces de transport și captare în granulele de depozit. CA pot fi de asemenea transportate prin membrana celulelor musculare netede, glandulare, la nivelul miocardului și a altor structuri efectorii.

Scanned with OKEN Scanner

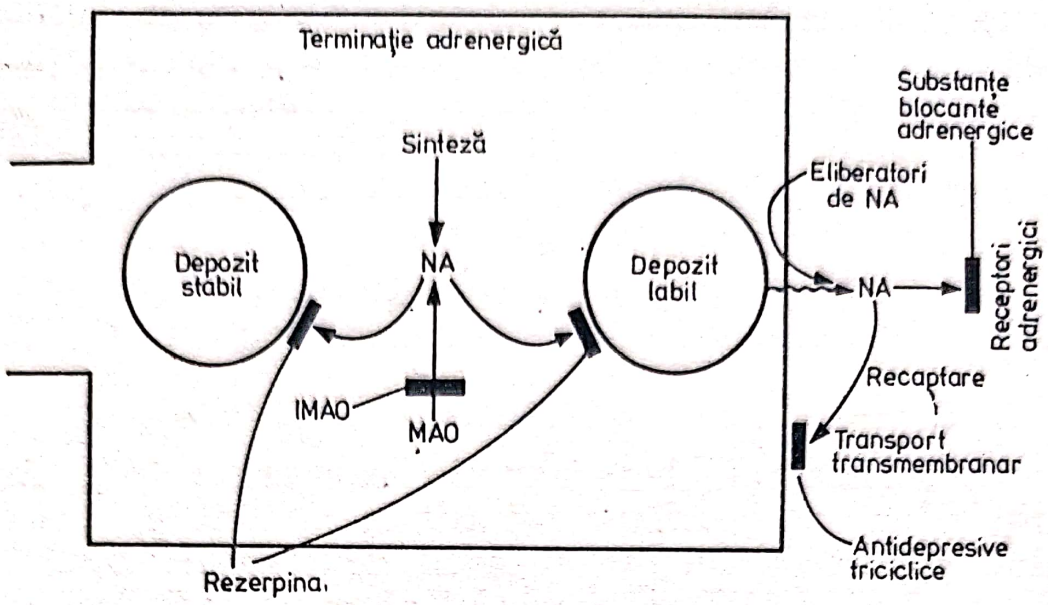


Fig. 4.2. Mecanisme farmacodinamice adrenergice şi adrenoblocante

Procesul de captare atît în structurile nervoase adrenergice centrale cît şi periferice este practic identic şi se realizează printr-un sistem de transport activ membranar [63]. Acest sistem este saturabil, are o afinitate preferenţială pentru noradrenalină, afinitatea pentru adrenalină fiind redusă la jumătate. Transportul transmembranar se realizează selectiv faţă de diferite structuri stereochimice [63; 132; 133], fiind preferenţial captată 1-noradrenalina, proprietate întîlnită şi la alte sisteme de captare a aminelor neurotransmiţătoare. În afară de noradrenalină şi adrenalină sînt captaţi şi alţi derivaţi, fenomen cu importante implicaţii farmacologice. Cerinţele structurale pentru captarea catecolaminelor şi derivaţilor în structurile nervoase sînt: absenţa grupului de substituţie la azot (izoprenalina nu este captată), absenţa grupului metoxi pe nucleul aromatic (normetadrenalina nu este captată), prezenţa a cel puţin unui grup hidroxil (amfetamina, norefedrina nu sînt captate). Alte caracteristici importante sînt: dependenţa de temperatură, inhibiţia prin toxice metabolice, anoxie etc., necesitatea prezenţei sodiului şi a unor concentraţii scăzute de potasiu [61—63].

Proporţia procesului de captare depinde în anumite limite de concentraţia relativă a noradrenalinei şi adrenalinei.

La concentraţii scăzute de catecolamine operează procesul de captare în structurile nervoase *(uptake$_1$)*, în timp ce la concentraţii mari captarea CA se face mai rapid în anumite ţesuturi

(uptake$_2$) [62, 63]. Spre deosebire de tipul precedent de captare, cel din țesuturi are deci afinitate mai scăzută pentru CA dar are capacitate mai mare, nu este semnificativă la concentrații mici de CA, nu manifestă specificitate stereochimică și are afinitate mai mare pentru adrenalină decît pentru noradrenalină. Mai mult, captarea la nivelul tisular se poate realiza și pentru izoprenalină. Captarea în țesuturi poate fi interpretată ca un proces ce precede metabolizarea intracelulară a CA în timp ce captarea în structurile nervoase se soldează cu reținerea CA și depozitarea lor.

4.2.1. *Inhibitori ai captării CA*

Procesele de captare a CA cu diferite localizări neuronale și extraneuronale, în afară de diferențele deja menționate, prezintă o sensibilitate farmacologică diferită în funcție de localizarea respectivă. Așa de exemplu, după cum se observă și în tabelul I, din punct de vedere structural și farmacodinamic substanțe active diferite blochează eficient cele trei modalități de captare a CA (vezi fig. 4.2).

TABELUL I

Inhibitori ai diferitelor modalități de captare a catecolaminelor

Captare neuronală — Pompa membranară (inima de șobolan)	DI_{50} (μM)	*Captare în granule*	DI_{50} (μM)	*Captare extraneuronală (inima de șobolan)*	DI_{50} (μM)
Desipramina	0,01	Rezerpina	0,06	Fenoxibenzamina	2,8
(−) Metaraminol	0,08	Prenilamina	0,6	Corticosteron	2,7
(+) Amfetamina	0,18	Tetrabenazina	5,0	(±) Metanefrina	—
Cocaina	0,38	Clorpromazina	20,0		
Fenoxibenzamina	0,78				

Inactivarea procesului de captare, la unul din nivelele respective, prin diferite substanțe, are implicații farmacologice importante. Se admite de exemplu că potențarea efectelor CA după prealabila administrare de cocaină sau antidepresive

triciclice este consecința tocmai a blocării mecanismului de captare neuronală (sau în terminațiile nervoase), ceea ce crește implicit interacția cu receptorii adrenergici din țesuturile efectorii. Dintre substanțele care blochează captarea CA în veziculele sinaptice, rezerpina, prenilamina, tetrabenazina și clorpromazina prezintă importanță deosebită. Rezerpina inhibă captarea la concentrații de ordinul a 10^{-8} M printr-un mecanism inițial competitiv cu transportul aminelor. În cazul rezerpinei ca și altor substanțe de acest tip blocajul captării CA nou sintetizate precum și al recaptării celor eliberate prin stimulare nervoasă și transportate în citoplasmă duce la depleție și implicit simpatoliză.

Cazul fenoxibenzaminei cunoscută în primul rînd ca substanță α-adrenoblocantă este de un deosebit interes farmacologic, evidențiind importanța mecanismelor *feed-back* în controlul eliberării CA. Astfel blocarea α-receptorilor prin fenoxibenzamină inactivează mecanismul prin care NA își inhibă propria eliberare, fenomen care este evident la concentrații de 10^{-8} M de fenoxibenzamină. În afară de acest proces, inhibiția propriu-zisă a captării CA devine evidentă la concentrații mai mari de fenoxibenzamină. Consecințele blocării procesului captării sînt diferite, în funcție de particularitățile mecanismului de acțiune a substanței respective. În majoritatea cazurilor blocarea captării, cu sau fără depleția depozitelor, duce la creșterea sensibilității structurilor postsinaptice la CA. Blocul captării prin rezerpină este ireversibil asociat cu depleție și blocul transmisiei, refacerea rezervelor efectuîndu-se prin neosinteză de granule, proces ce începe la 24—48 ore de la administrarea rezerpinei. Tratamentul cu rezerpină induce creșterea tirozin-hidroxilazei și dopamin-β-hidroxilazei, ca urmare a creșterii frecvenței impulsurilor preganglionare. Refacerea completă a capacității de captare și implicit a transmisiei se realizează după 48—72 de ore de la administrarea rezerpinei (10 mg/kg corp intraperitoneal la șobolan) [26].

În afară de mecanismul de captare sensibil la rezerpină a fost pus în evidență un mecanism rezistent la rezerpină [52; 87]. Metaraminolul este captat prin intermediul acestui din urmă mecanism mai mult decît noradrenalina în timp ce dopamina

este captată prin ambele mecanisme [86]. Remarcabil că doze mari de dopamină administrate după rezerpinizare și inhibiția monoamin-oxidazei produc reluarea răspunsului la stimularea nervoasă. Astfel, se pare că dopamina este captată printr-un mecanism rezistent la rezerpină și prin β-hidroxilare se transformă în noradrenalină la nivelul granulelor.

S-a arătat că viteza de captare a noradrenalinei în inima de șobolan nu este modificată de pretratamentul cu rezerpină *in vivo*. Noradrenalina exogenă se acumulează practic numai în fracțiunea solubilă supernatantă și aceasta nu diferă cantitativ față de acumularea în inima normală. Aceasta corespunde cu faza inițială, rapidă, a procesului de captare, respectiv de transport în membrana axonică, în timp ce faza lentă de captare, care corespunde intrării noradrenalinei intracelulare în granulele specifice, este abolită de pretratamentul cu rezerpină [60]. Aceasta explică de ce blocul captării catecolaminelor prin rezerpină este asociat cu blocul transmisiei și cu o hipersensibilitate la catecolaminele exogene mai scăzută decît cea produsă de cocaină care blochează etapa membranară de captare. În cazul rezerpinei menținerea capacității de transport prin membrana axonică și blocul captării intragranulare expun catecolaminele la acțiunea MAO. În schimb cocaina, prin blocarea transportului prin membrana neuronală, crește concentrația de catecolamine în vecinătatea receptorilor, ceea ce se evidențiază prin efecte adrenergice și hipersensibilitate la catecolamine, fenomene care se amplifică suplimentar chiar și la animalele pretratate cu rezerpină. Dintre blocanții eficienți ai captării prin membrana neuronală (pompa de membrană) se evidențiază în primul rînd derivații triciclici de tipul imipraminei și desipraminei care reduc cu 50% captarea catecolaminelor (DI_{50}) la concentrații de 0,09μM și respectiv de 0,01μM. Aceste substanțe, în mod uzual, nu produc depleția catecolaminelor din depozitele cunoscute. Derivații de tipul imipraminei precum și cocaina sînt inhibitori competitivi ai transportului transmembranar al catecolaminelor, ceea ce necesită menținerea unei concentrații relativ înalte a acestui tip de inhibitori și implicit creșterea concentrației de catecolamine putînd reduce semnificativ eficiența blocajului captării [62].

Scanned with OKEN Scanner

4.3. Depozitarea

După efectuarea transportului catecolaminelor prin membrana axonică acestea sînt supuse unei redistribuţii, prin depozitarea în granulele de depozit, scăzînd astfel concentraţia de catecolamine libere şi gradientul respectiv. Depozitarea în granule sau în vezicule a catecolaminelor reprezintă un proces de chelare cu ATP în raport molar de 4/1. Realizarea acestui chelat s-ar efectua prin intermediul complexului Mg^{2+}—ATP sau Cu^{2+}—ATP. Există o mai bună corelaţie între afinitatea CA pentru granulele de depozit şi legarea cu complexul Cu^{2+}—ATP în comparaţie cu legarea de complexul Mg^{2+}—ATP [104]. Prin captare şi depozitare se realizează în fapt o excepţională concentrare a catecolaminelor în terminaţiile nervoase adrenergice. Datele de histochimie evidenţiază că în aceste terminaţii noradrenalina poate depăşi 10 000 μg/g ţesut, în timp ce în alte regiuni ale neuronului atinge valori de 100—500 μg/g [61]. Depozitarea în granule realizează de asemenea protecţia catecolaminelor de acţiunea monoamin-oxidazei mitocondriale. Mai mult, sînt supuse procesului de eliberare prin stimulare nervoasă numai catecolaminele depozitate în aceste granule. Granulele de depozit conţin alături de catecolamine şi ATP, proteine care sînt sintetizate în corpul celular şi supuse unui proces de transport axoplasmic alături de proteinele cu funcţie enzimatică implicate în sinteza catecolaminelor. Dintre acestea din urmă, dopamin-β-hidroxilaza este predominent localizată în granule. Prin ligatura nervului sciatic la şobolan s-a putut demonstra că refacerea depozitelor de CA după rezerpinizare este proporţională cu creşterea transportului axoplasmic de noi granule de depozit sintetizate în corpul celular [26; 125].

În funcţie de răspunsul la tiramină se disting două tipuri de depozite: un depozit mic, uşor disponibil pentru eliberare, şi un depozit mai mare, stabil. Se admite că depozitul mic, uşor mobilizabil este menţinut prin recaptarea CA eliberate în prealabil precum şi prin neosinteză. Între depozitul uşor mobilizabil şi cel stabil există un transfer reciproc de CA, cel stabil încărcîndu-se mai lent, prin intermediul primului depozit care la rîndul său se poate reumple din cel stabil [26]. Deoarece depozitarea iniţială se face în depozitul uşor mobilizabil acesta

Scanned with OKEN Scanner

poate fi ipotetic localizat în granulele tinere, de dimensiuni mai mari în timp ce depozitul stabil este localizat în granulele de dimensiuni mai mici [26]. Există dovezi care sugerează o contribuție directă, importantă și a veziculelor de dimensiuni mici la eliberarea transmițătorului [36].

4.4. Eliberarea CA

Eliberarea CA se realizează prin transferul NA și/sau A din granulele de depozit în spațiu sinaptic sau extra-celular (vezi fig. 4.2). Etapele, în detaliu, implicate în acest proces presupun fie eliberarea CA din granulele de stocaj în citosol și de aici în spațiul extracelular, fie eliberarea directă a conținutului granulelor în afara celulelor. Caracteristicile procesului de eliberare a CA evocată prin stimulare nervoasă precum și argumentele de ordin farmacologic fac improbabilă eliberarea CA din granule sau vezicule via citosol [114]. S-a stabilit astfel că, eliberarea NA și A din terminațiile nervoase simpatice sau medulosuprarenală este asociată cu apariția în plasmă a unor componente proteice solubile printre care cromogranina A și dopamin-β-hidroxilaza. Aceasta constituie o dovadă mai directă privind eliberarea CA prin exocitoză. Eliberarea NA din terminațiile nervoase se produce după depolarizarea declanșată de impulsul nervos generat de corpul neuronal. Veriga între procesul de depolarizare și cel de eliberare o constituie influxul ionilor de Ca. Absența calciului abolește eliberarea de NA prin stimulare nervoasă, cantitatea de mediatori eliberată crescînd proporțional cu concentrația extracelulară de calciu pînă la valoarea de 7,5 mM. Veziculele sinaptice migrează din axoplasmă spre membrana plasmatică, realizîndu-se fuziunea dintre cele două membrane. Conținutul de CA părăsește vezicula prin difuzie, prin forțe tensionale de suprafață sau printr-un mecanism contractil de membrană. Membrana veziculară, în întregime, nu părăsește celula și nu rămîne atașată de membrana plasmatică după exocitoză, ci generează cîteva vezicule de dimensiuni mai mici. Se pare că veziculele noradrenergice sînt reutilizate după golire, fiind reîncărcate cu NA pentru a fi din nou eliberate la nivelul sinapsei. Dacă se admite că 1/4 pînă la 1/3 din NA eliberată este recaptată ar putea rezulta că fiecare

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

vezicule este refolosită de trei ori [63; 114]. Pierderea unei cantități de peste 30% de dopamin-β-hidroxilază în anumite condiții de creștere a eliberării de NA [36] sugerează însă pierderea sau distrucția veziculelor după eliberarea conținutului lor. O etapă importantă în controlul eliberării NA o constituie receptorii colinergici existenți la nivelul terminațiilor simpatice. Astfel stimularea receptorilor nicotinici produce eliberare de NA, în timp ce stimularea receptorilor muscarinici scade cantitatea de NA eliberată [114]. În medulosuprarenală celulele cu conținut de NA posedă însă receptori nicotinici, în timp ce celulele conținătoare de adrenalină posedă receptori muscarinici. Numeroase argumente experimentale susțin ipoteza existenței unei verigi colinergice ce precede eliberarea de NA [20; 21]. În esență, secvența presupusă ar fi: impulsul nervos simpatic eliberează Ach, aceasta depolarizează terminația nervoasă permițînd intrarea calciului care realizează fuziunea membranei veziculare cu membrana plasmatică și expulzia sau difuzia în spațiul extracelular a conținutului vezicular. O altă modalitate fiziologică de control a eliberării de NA este realizată prin intermediul prostaglandinei E_2. Prostaglandinele seriei E eliberate prin stimularea nervilor adrenergici exercită o acțiune locală inhibitorie *(feed back* negativ*)* asupra eliberării suplimentare de NA ca răspuns la stimularea nervoasă. Inhibitorii sintezei prostaglandinelor (de tipul aspirinei sau acidului eicosatetranoic) furnizează dovezi suplimentare în acest sens, administrarea lor crescînd eliberarea de NA prin stimulare nervoasă [53; 57].

4.4.1. *Eliberatori de CA*

Clasificarea aminelor simpatomimetice se realizează în funcție de sensul modificării efectelor lor după cocaină, după rezerpină sau după tiramină. Cocaina potențează efectele simpatomimeticelor directe și antagonizează pe cele indirecte. De menționat însă că potențarea se realizează numai pentru simpatomimeticele directe care sînt supuse captării (ex. NA, A) și nu pentru cele care nu sînt transportate transmembranar (izoprenalina, metoxamina). Acest ultim criteriu deci nu poate caracteriza adecvat toate aminele simpatomimetice.

Rezerpina, prin blocajul captării în veziculele de depozit, produce depleție și abolește efectele simpatomimeticelor indirecte, potențînd însă efectele celor directe. Denervarea produce depleția catecolaminelor din depozite cu abolirea răspunsului la simpatomimeticele indirecte și hipersensibilitate la cele cu acțiune directă și care sînt supuse captării. În cazul membranei nictitante însă apariția unei hipersensibilizări de tip decentralizare [130; 131] (prin secționarea fibrei preganglionare) atît față de simpatomimeticele directe cît și indirecte complică interpretarea datelor.

Tiramina posedă slabe acțiuni directe asupra receptorilor α- și β-adrenergici. Dovezi farmacologice directe evidențiază capacitatea tiraminei de a elibera NA. Tiramina poate fi captată prin membrana neuronală și din citoplasmă în veziculele de depozit unde este convertită de către dopamin-β-hidroxilază în octopamină. Acest proces este favorizat de către inhibitorii de MAO care cresc cantitatea de tiramină circulantă, disponibilă pentru captarea și conversia menționată. Este posibil ca subsecvent procesului de captare în veziculele de depozit, tiramina să deplaseze NA din vezicule în citosol și să crească astfel eliberarea spontană de mediator adrenergic. Tiramina este captată în vezicule printr-un mecanism rezistent la rezerpină, mecanism presupus a fi implicat în realizarea efectelor aminelor simpatomimetice indirecte [131; 132]. Deși cantitatea de NA eliberată de tiramină este mică, efectele simpatomimetice ale acesteia sînt semnificative datorită împiedicării recaptării NA eliberate [81]. Particularitățile structurale ale octopaminei permit reținerea ei în veziculele sinaptice în timp ce tiramina se pierde rapid. Rezultă din acțiunea tiraminei și a falsului transmițător format octopamina un fenomen bine cunoscut — tahifilaxia, caracteristic pentru aminele simpatomimetice indirecte la repetarea administrării lor la intervale scurte. Perfuzia cu NA reface complet și rapid răspunsul la tiramină dar pentru o unică administrare. Datele furnizate prin utilizarea tiraminei sugerează astfel că numai un mic compartiment al depozitelor de NA este accesibil prin tiramină și anume veziculele periferice, unde dezaminarea prin MAO mitocondrială este mult redusă. Caracteristicile procesului de eliberare a NA prin tiramină sînt printre altele [114]:

1. Prevenirea eliberării NA prin cocaină la concentrații la care însă nu afectează eliberarea prin impuls nervos.

2. Inhibitorii MAO cresc eliberarea de NA prin tiramină dar nu și prin impulsul nervos.

3. Eliberarea NA de către tiramină nu se face prin exocitoză, depozitele respective fiind, cel puțin în parte, indisponibile la eliberarea prin impuls nervos (NA din citosol).

4. Calciul extracelular nu este necesar pentru eliberarea NA prin tiramină.

5. Tetrodotoxina nu previne eliberarea NA prin tiramină dar previne eliberarea prin impuls nervos și prin nicotină.

6. Prostaglandinele din seria E nu modifică eliberarea NA prin tiramină.

7. Eliberarea NA prin tiramină nu este asociată cu eliberarea de dopamin-β-hidroxilază.

În categoria substanțelor de tip tiraminic pot fi considerate, în anumite limite, efedrina, amfetamina și derivații, cocaina, substanțele nicotinice etc., fiecare avînd particularitățile sale de acțiune și/sau o componentă directă de acțiune asupra receptorilor respectivi.

4.4.2. *Blocanți ai eliberării de CA*

Numeroși agenți farmacodinamici de tipul anestezicelor locale, fenotiazinelor sau a altor stabilizatori de membrane pot interfera cu procesul de eliberare a CA.

Un loc aparte îl ocupă substanțele blocante neuronale care suprimă răspunsul la stimulare nervoasă dar nu influențează sau cresc răspunsul la administrarea de CA [17]. În această categorie pot fi enumerate: xilocolina (TM_{10}), bretiliul, guanetidina, betanidina, guanadrelul, guanicidina etc. [17, 85]. Pe baza datelor experimentale se admite că aceste substanțe au atît un efect stabilizator asupra depozitelor de NA cît și de golire a acestora, raportul dintre aceste efecte variind în funcție de compus [17]. Substanțele blocante neuronale sînt supuse unui proces de captare, în terminațiile nervoase adrenergice, similar cu NA, proces inhibat de NA, fenoxibenzamină, amfetamină, desipramină [17; 75; 85].

Guanetidina produce depleția de NA printr-un mecanism diferit de rezerpină, mecanism în care este implicată și o componentă inițială de eliberare de NA. Depleția indusă de guanetidină nu poate fi singura cauză a blocajului transmisiei deoa-

rece aceasta din urmă se produce mai tîrziu decît debutul blocajului. Captarea şi distribuţia celulară a guanetidinei este foarte asemănătoare cu a noradrenalinei. Spre deosebire de majoritatea agenţilor blocanţi neuronali, guanetidina nu inhibă MAO, astfel că noradrenalina eliberată este metabolizată şi pierdută din terminaţiile nervoase. Bretiliul prezintă diferenţe în mecanismul său de acţiune faţă de guanetidină. Bretiliul nu produce o eliberare importantă de noradrenalină, previne însă eliberarea indusă de guanetidină şi nu blochează depleţia indusă de rezerpină. Captarea bretiliului nu modifică pe cea a guanetidinei şi nu este influenţată de catecolamine sau rezerpină. Faptele experimentale pledează astfel pentru interferenţa bretiliului cu procesele ce duc la eliberarea de noradrenalină. În acest sens efectul de stabilizare a membranei, asemănătoare cu cel dat de anestezicele locale, poate constitui o componentă esenţială în realizarea blocajului eliberării atît pentru bretiliu cît şi pentru alţi agenţi blocanţi neuronali.

4.5. Captarea şi eliberarea de falşi transmiţători adrenergici

Datorită relativei nespecificităţi de substrat a enzimelor implicate în sinteza catecolaminelor, diferiţi analogi aminoacizi sau feniletilamine pot fi preluaţi ca substrat generîndu-se astfel falşi transmiţători. Alte substanţe administrate ca mijloace farmacodinamice pot fi de asemenea captate prin mecanismele cunoscute şi eliberate ca falşi transmiţători (fig. 4.3). În acest sens sînt cunoscute procesele de hidroxilare catalizate de tirozin-hidroxilază asupra fenilalaninei, α-metiltirozinei, metaraminolului chiar dacă reacţia se desfăşoară la o viteză mult mai mică în comparaţie cu hidroxilarea tirozinei. De asemenea un număr de aminoacizi aromatici sînt decarboxilaţi de către dopa-decarboxilază (aromatic *L*-amino-acid-decarboxilază) formînd de exemplu α-metil-dopamină din α-metil-dopa, metatiramină din metatirozină, α-metil-metatiramină din α-metil-metatirozină etc. Dopamin-β-hidroxilaza este de asemenea relativ nespecifică faţă de substrat şi converteşte α-metildopamina în α-metil noradrenalină. Pentru dopamin-β-hidroxilaza pot constitui de asemenea substrat: tiramina, α-metil-tiramina, meta-tiramina, α-metil-metatiramina. La nivelul medulosuprarenalei, PNMT metilează nu numai noradrenalina ci şi alte

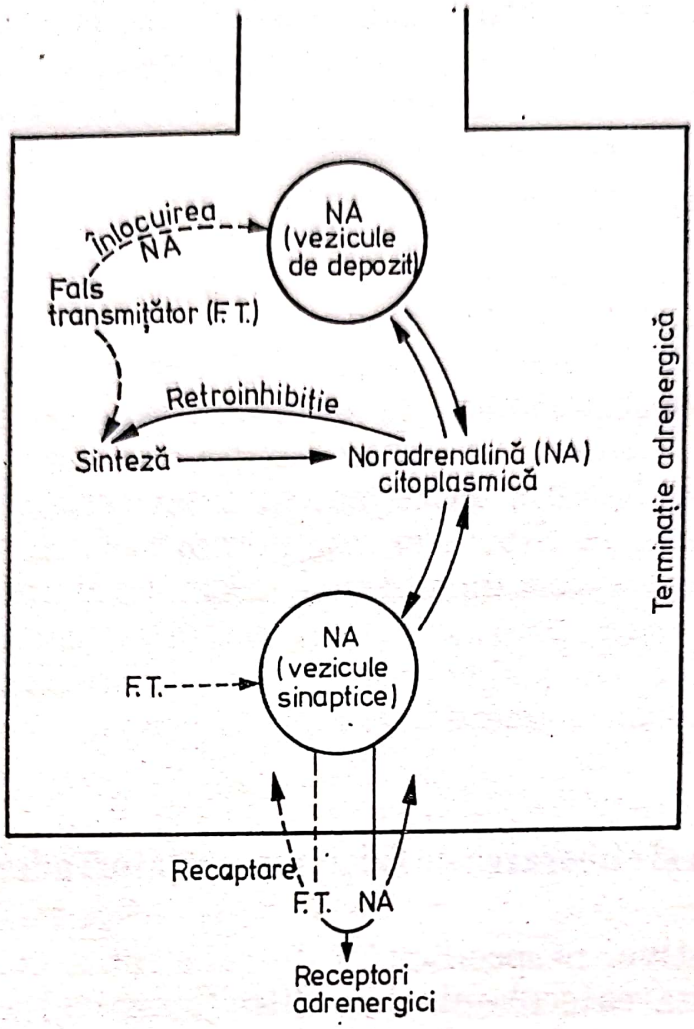


Fig. 4.3. Diferite nivele de interferență a falșilor transmițători cu transmisia adrenergică

amine de tipul fenil-etanolaminei, octopaminei, α-metil-noradrenalinei etc. Printre substanțele apte de a deveni falși transmițători, metaraminolul și α-metil-octopamina ocupă un loc aparte datorită rezistenței lor atît la acțiunea MAO cît și a COMT. Captarea se exercită asupra substanțelor care îndeplinesc condițiile structurale menționate anterior. În cazul metaraminolului de un interes special este faptul că cei doi izomeri optici sînt transportați prin membrana neuronală dar numai l-izomerul poate fi captat în veziculele de depozit unde deplasează noradrenalina. Izomerul dextrogir al metaraminolului nu este reținut și astfel părăsește țesuturile.

Administrarea repetată a falșilor transmițători se soldează cu acumularea lor progresivă și pierderea NA endogene. Dintre falșii transmițători testați: metaraminolul, dihidroxiefedrina, dihidroxipseudoefedrina și octopamina pot genera

acest tip de efecte [90; 91; 92]. Una din condițiile ce definește falsul transmițător (în afară de acumularea în veziculele sinaptice) este aceea de a fi eliberat prin stimulare nervoasă sau prin substanțe eliberatoare de CA [68]. Majoritatea substanțelor care pot funcționa ca falși transmițători au eficiență mai scăzută decît A și NA și aceasta, alături de deplasarea CA fiziologice din depozite, duce la scăderea efectelor stimulatorii nervoase, respectiv la scăderea tonusului nervos adrenergic periferic. Dintre falșii transmițători, eficiențe comparabile cu CA fiziologice au doar α-metilnoradrenalina și α-metiladrenalina. Concordant cu mecanismele precedente, falșii trasmițători pot scădea și sinteza CA în mai multe modalități: prin inhibiția tirozin-hidroxilazei (ex. α-metil-dopamina și α-metil-noradrenalina) prin mecanism *feed-back* negativ, asemănător inhibiției sintezei CA prin NA sau prin afectarea distribuției și transportului intraneuronal al CA [68]. O particularitate o prezintă depleția diferențială a unor falși transmițători de tipul α-metilnoradrenalinei de către rezerpină. Aceasta din urmă golește mai puțin eficient α-metil-noradrenalina în comparație cu noradrenalina endogenă. Depleția falsului transmițător este accentuată însă dacă acesta este susceptibil de a fi oxidat de MAO.

4.6. Receptorii adrenergici

Clasificarea modernă a receptorilor adrenergici propusă de Ahlquist în 1948 (42) pe baza sistematizării datelor experimentale privind eficacitatea diferitelor CA admite existența a două tipuri distincte de receptori, denumiți α și β, responsabili după activare, de efecte fiziologice sau farmacologice bine caracterizate. În fapt, activarea α-receptorilor mediază contracția musculaturii netede cu excepția musculaturii netede intestinale (nesfincteriene) unde se produce relaxare (tabel II). Activarea β-receptorilor mediază efecte de relaxare a musculaturii netede, de stimulare a funcțiilor miocardice precum și efecte metabolice.

Încercările de caracterizare fizico-chimică a receptorilor, corelate cu datele farmacologice, au permis progrese semnificative în cunoașterea acestor entități. Locurile de legare ale

TABELUL II

Efectele stimulării receptorilor alfa adrenergici

Țesutul	*Efect*	*Substanțe blocante (tipuri)*
Mușchi neted intestinal	Relaxare	Fentolamina Haloalchilamine Alcaloizii din ergot
Beta celulele pancreatice	Scăderea secreției de insulină	
Piele de broască	Agregarea melaninei	
Joncțiune neuro-musculară	Facilitarea transmisiei	

agoniștilor adrenergici pot fi solubilizate, determinările sugerînd existența unei proteine cu grupări SH funcționale [32; 78]. Greutatea moleculară este cuprinsă între 40 000 și 160 000. Constanta de afinitate pentru NA este de 10^6 — 10^7 pentru țesutul cardiac, 10^5 — 10^7 pentru ficat și capsula splenică etc. [29; 32; 79].

4.6.1. *Receptorii α-adrenergici*

În ceea ce privește receptorii α-adrenergici, datele farmacologice permit o caracterizare adecvată și accepțiunea că există un singur tip de receptor α. Receptorii α-adrenergici controlează tonusul vascular, mediind contracția vaselor pre- și postcapilare și a sfincterului precapilar. Acțiunea constrictivă este predominentă însă la nivel precapilar. Procesele metabolice locale antagonizează contracția α-adrenergică în funcție de zona în discuție, astfel: sfincter precapilar > vase precapilare > vase postcapilare [95]. Procesele intime implicate în activarea receptorilor α-adrenergici au fost analizate de diverși autori. Se sugerează astfel existența unei căi de activare a glicogenolizei, distinctă de activarea prin proteinkinaza-*c*AMP dependentă, activare în care receptorul alfa cuplează contracția cu glicogenoliza prin creșterea disponibilității calciului. Catecol-

aminele ar cataliza o reacţie de tip ATP-azic cu scindarea consecutivă a ATP în prezenţa calciului. ATP-aza ar servi astfel ca receptor alfa pentru catecolamine. Modificările conformaţionale subsecvente transferului grupării fosfat terminale a ATP permit influxul de calciu şi activarea procesului contractil. Acceptorul grupării fosfat ar fi funcţia carboxilică a unei proteine care, în cazul interacţiunii cu substanţele α-blocante alchilante, ar fi inaptă de a accepta fosfatul şi, implicit, activarea receptorului ar fi blocată.

Ordinea potenţei celor mai cunoscute catecolamine este: NA ⩾ A ≫ izoprenalina. Relaxarea musculaturii intestinale, ca mecanism, este total diferită de cea prin stimulare β-adrenergică, presupunînd creşterea permeabilităţii membranei celulare la K^+ şi respectiv influxul de Ca^{2+}.

Se admite că interacţia agoniştilor şi antagoniştilor cu receptorii alfa se efectuează la locuri diferite [5], ipoteză susţinută de absenţa analogiei structurale la diferite grupe de substanţe α-blocante. Pentru agoniştii adrenergici, datele experimentale evidenţiază importanţa grupului aminic pentru interacţia cu receptorii α-adrenergici. Introducerea unor grupări *N*-alchil de dimensiuni din ce în ce mai mari duce la scăderea eficienţei lor ca α-adrenergice şi creşterea concomitentă a eficienţei ca β-adrenergice. Eliminarea hidroxizilor fenolici duce la o netă scădere a afinităţii pentru receptorii α-adrenergici şi o scădere a activităţii intrinsece faţă de receptorii β-adrenergici. Substituţia unui OH fenolic printr-un grup metilsulfonamidic, care se comportă în anumite limite ca izoster al OH fenolic, duce la obţinerea unor substanţe α-adrenergice şi în acelaşi timp β-blocante adrenergice. Aceste corelaţii structurale subliniază suplimentar proprietăţile şi configuraţia receptorului α-adrenergic.

4.6.2. *Receptorii β-adrenergici*

Date experimentale convingătoare au permis clasificarea receptorilor β-adrenergici în două subtipuri [6; 73]. Din studiul efectelor catecolaminelor la diferite nivele funcţionale, din calculul şi comparaţia coeficienţilor de corelaţie rezultă două grupe de răspunsuri distincte.

Scanned with OKEN Scanner

Într-una din grupe se încadrează creșterea forței și vitezei de contracție, lipoliză, relaxarea intestinală și calorigeneza. Celălalt grup include vasodilatația, bronhodilatația, relaxarea uterină, facilitarea contracției musculaturii striate, hiperlactacidemie, hiperglicemie. Răspunsurile din prima categorie sînt considerate a fi mediate de subtipul β_1- receptor iar cel de al doilea grup de un alt subtip denumit β_2-receptorul adrenergic. Proprietățile farmacologice diferențiale ale celor două subtipuri de receptori β-adrenergici constă în faptul că:

1. Noradrenalina are eficacitate egală sau mai mare decît adrenalina ca stimulator al β_1-receptorilor în timp ce aceasta din urmă este semnificativ mai eficientă la nivelul β_2-receptorilor.

2. Izoproterenolul este de 5 ori mai activ stimulator al β_1-receptorilor în raport cu noradrenalina și de aproximativ 100 ori mai activ decît aceasta din urmă ca stimulator al β_2-receptorilor.

3. Substanțele β-blocante (fig. 4.4) pot bloca fie ambele subtipuri de receptori, cum e cazul propranolului, fie blochează preferențial β_1-receptorii (practolol) sau β_2-receptorii (butoxamina).

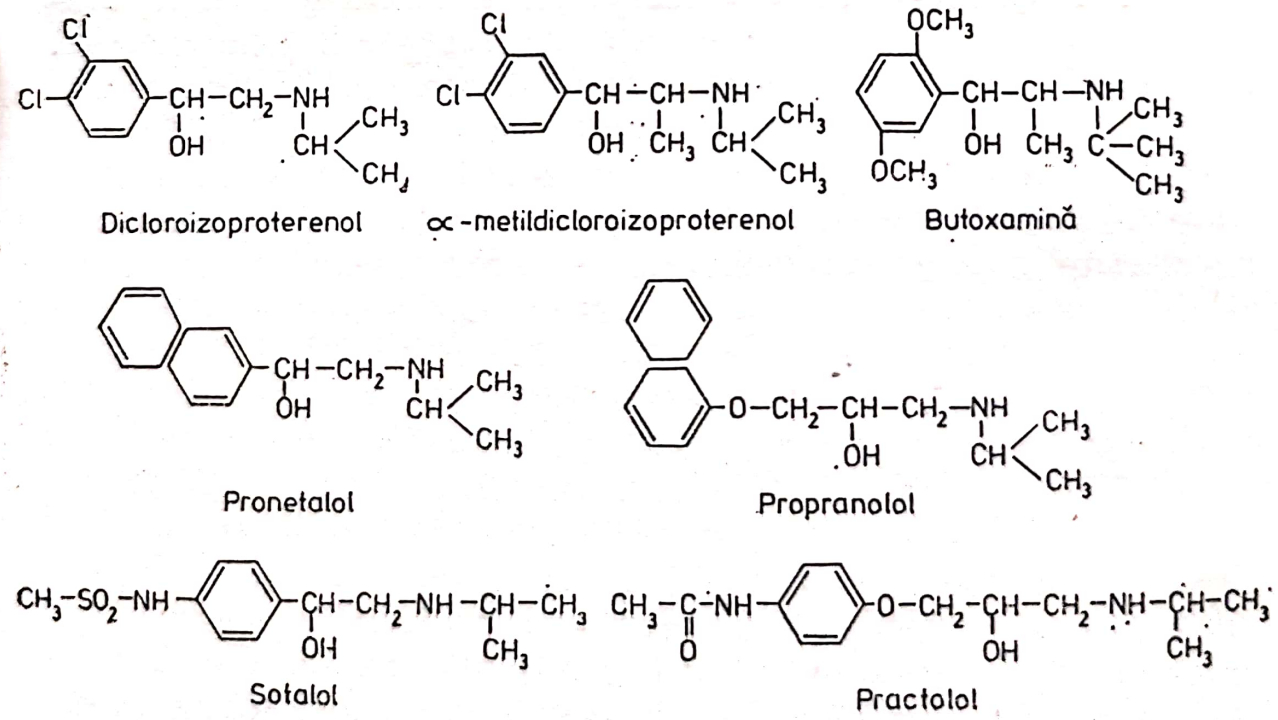


Fig. 4.4. Structurile unor substanțe beta-blocante adrenergice

În capitolul privind corelațiile farmacologice ale sistemului AMP ciclic am prezentat principalele argumente care pledează pentru identitatea adenilat-ciclazei cu receptorul β-adrenergic. Interrelațiile atît ale receptorului α cît și ale receptorilor β-adrenergici cu adenilat-ciclaza au sugerat diferite modele în care spre exemplu subunitatea sau subunitățile catalitice ale adenilat-ciclazei sînt legate cu diferite tipuri de subunități reglatoare, din care una cu proprietăți de α-receptor iar cealaltă de β-receptor adrenergic. Activarea subunității reglatoare de tip α-receptor, prin interacție directă sau mediată cu un agonist α adrenergic, duce la scăderea activității adenilat-ciclazei, în timp ce activarea subunității de tip β-receptor duce la creșterea activității enzimei. În favoarea unei neidentități a receptorului β-adrenergic cu adenilat-ciclaza pledează efectele blocante specifice ale propranololului față de activarea prin CA a adenilat-ciclazei și ineficiența față de activarea prin alți hormoni. Răspunsul contractil cardiac — inotrop pozitiv, activarea fosforilazei și glicogenolizei la stimularea prin CA sînt influențate prin factorii (Ca^{+2}) care nu influențează în sens pozitiv adenilat-ciclaza.

Interacția eficientă dintre receptorii β-adrenergici și agoniști necesită structural, printre altele, nucleul catecolic. Eliminarea unui OH fenolic sau substituția cu alți radicali în molecula izoproterenolului duce la pierderea activității intrinsece.

În acest sens un exemplu concludent îl constituie diclorizoproterenolul la care substituția hidroxizilor fenolici cu clor dă naștere unei substanțe blocante a receptorilor beta.

În afară de substituția alchilică la gruparea aminică, o altă modificare structurală care favorizează acțiunea β-adrenergică este introducerea unui metil la carbonul alfa al lanțului lateral.

4.6.3. *Interacția receptorilor adrenergici cu agoniștii și antagoniștii adrenergici*

Interacția dintre agoniștii adrenergici și receptorii specifici respectivi poate fi tratată ca o reacție bimoleculară, reversibilă, conformă legii acțiunii maselor, caracterizată de asemenea de constanta de disociere a complexului agonist-receptor [42].

Scanned with OKEN Scanner

Astfel,

$$\frac{E_A}{E_m} = f(S) = f\{\varepsilon[RA]\} = f\left\{\frac{\varepsilon[RA]}{R_t}\right\} = f\left\{\frac{e[A]}{K_A + [A]}\right\},$$

în care E_A = răspunsul la agonistul A
E_m = răspunsul maxim posibil al efectorului
S = stimulul
[RA] = concentrația complexului agonist — receptor
ε = activitatea intrinsecă a RA (de a genera un stimul)
R_t = concentrația totală a receptorilor
[A] = concentrația agonistului liber în echilibru cu RA.
K_A = constanta de disociere a RA.
e = eficacitatea.

Răspunsul efectorilor la un agonist dat este dependent de concentrația acestuia în imediata apropiere a receptorilor, concentrație influențată de factori complecși cum sînt: captarea neuronală și extraneuronală, modificată sau nu prin agenți farmacologici (rezerpină, cocaină) etc., prin denervare sau decentralizare [130; 131], prin modificarea activității MAO sau a COMT. Importanța proceselor de captare extraneuronală și consecințele modificării prin mijloace farmacologice asupra sensibilității efectorilor la agoniști adrenergici este schițată mai sus. Denervarea chirurgicală (secționarea postganglionară) are drept caracteristică absența consecutivă a captării neuronale. Ca urmare concentrația CA la nivelul receptorilor crește, fenomen ce se evidențiază printr-o hipersensibilitate la CA. Secționarea fibrei preganglionare (decentralizarea) se caracterizează prin faptul că hipersensibilitatea se manifestă nu numai față de toate aminele simpatomimetice ci și față de alți agenți cum ar fi acetilcolina și serotonina [130; 131]. Cocaina produce o sensibilizare similară cu denervarea, fenomen care nu apare însă după o prealabilă denervare sau după rezerpinizare. Cocaina sau rezerpina mimează parțial consecințele denervării, realizînd o „denervare farmacologică", reversibilă *in vivo*.

S-a demonstrat că administrarea de 6-hidroxidopamină duce la degenerarea selectivă a terminațiilor nervoase adrenergice cu pierderea implicită a capacității de captare și eli-

berare a NA. Această denervare chimică reproduce în bună măsură procesul de sensibilizare la NA prin denervare, cu o dinamică de instalare similară.

Fenomenul de sensibilizare postjoncțională în teritoriul adrenergic este generat de asemenea de substanțe blocante neuronale sau de substanțe blocante ale transmisiei ganglionare. Acest fenomen întîlnit și în teritoriul colinergic este un proces adaptativ, consecutiv întreruperii cronice a funcției neuronale, prin mijloace chirurgicale, farmacologice sau în condiții patologice, caracterizat prin creșterea sensibilității la factorii care pot declanșa răspunsul efectorului [38].

O modalitate farmacologică uzuală de modificare a interacției agonist-receptor o reprezintă antagoniștii adrenergici.

Antagoniștii la nivelul receptorilor adrenergici pot acționa într-o manieră competitivă, ceea ce are drept consecință o deplasare paralelă cu axa dozelor a curbei doză-răspuns sau de tip necompetitiv cu modificarea răspunsului maximal. Un aspect aparte îl constituie α-blocantele de tipul haloalchilaminelor care blochează ireversibil receptorii α-adrenergici. Substanțele α-blocante adrenergice cu excepția haloalchilaminelor precum și β-blocantele adrenergice blochează competitiv receptorii respectivi abolind parțial efectele stimulării nervoase simpatice sau ale administrării de adrenalină.

4.7. Degradarea enzimatică a catecolaminelor

Dacă procesul de captare activă a CA încheie (întrerupe) acțiunea lor asupra receptorilor specifici, degradarea acestor amine ca și a altora dealtfel este catalizată de MAO și COMT (fig. 4.5).

4.7.1. *Monoamin-oxidaza*

Monoamin-oxidaza catalizează reacția de dezaminare oxidativă a unor diverse amine care servesc drept substrat conform ecuației

$$R-CH_2-NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow R-CHO + NH_3 + H_2O_2$$

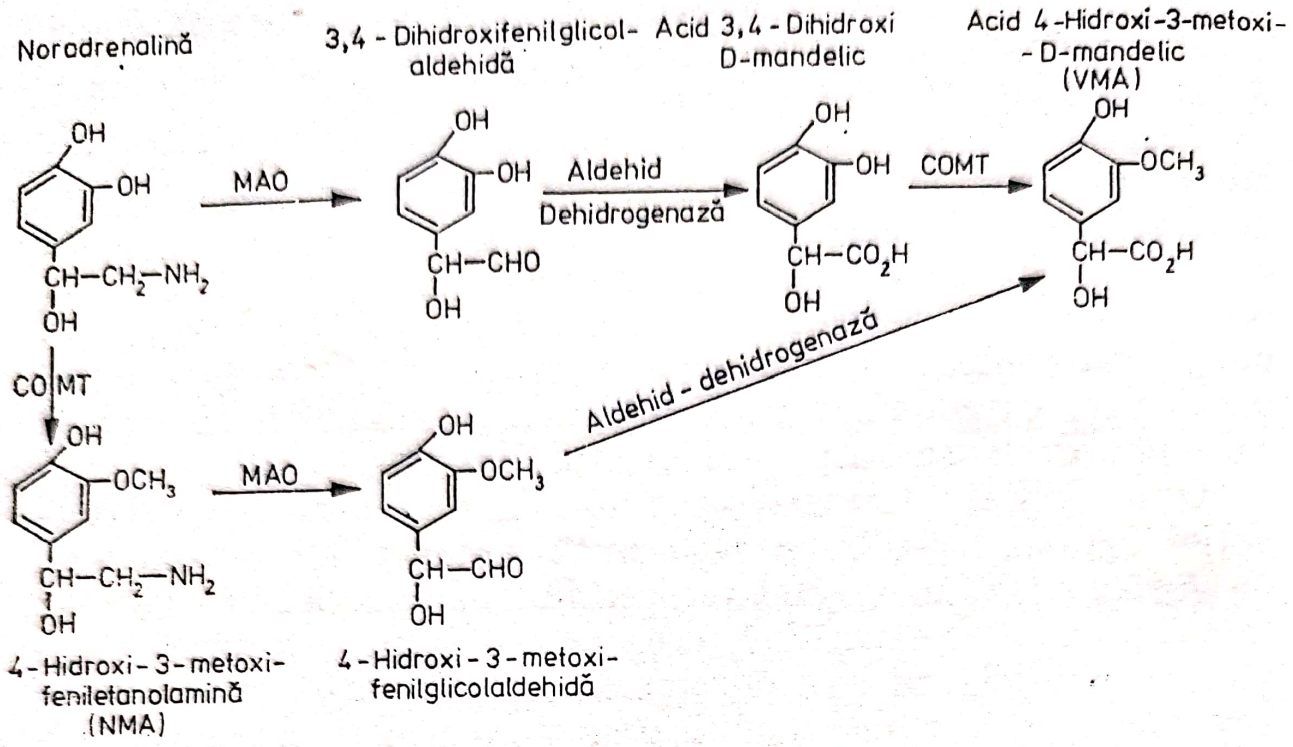


Fig. 4.5. Degradarea enzimatică a noradrenalinei

Greutatea moleculară a enzimei izolate din diferite țesuturi de la specii diverse variază în limite largi, de la 100 000 la peste 1 000 000 [126]. Enzima posedă un component flavinic a cărui fluorescență este marcat redusă în prezența substratului, ceea ce sugerează reducerea flavinei de către amină. Flavin-adenin-dinucleotidul este un cofactor cu grade variabile de legare la enzimă în funcție de specie. A fost pus în evidență, de asemenea, în diferite preparate enzimatice, prezența unor ioni metalici implicați probabil în activitatea enzimatică, din care cel mai frecvent sînt regăsiți ionii de Fe și de Cu. MAO este practic prezentă în aproape toate organele și țesuturile organismului, cu preponderență în ficat, intestin, rinichi, aortă etc. Localizarea sa intracelulară este aproape exclusivă la nivel mitocondrial, pe suprafața externă a membranei acestui organit. Simpatectomia produce scăderea cu 50% a MAO în vasul deferent, sugerîndu-se că restul de enzimă are localizare extraneuronală [66]. Se pare că există o bună corelație între densitatea inervației simpatice a unui organ, cantitatea de MAO și respectiv scăderea acesteia după denervare [66]. Specificitatea de substrat a MAO în organele denervate diferă de cea din organele normale. Curbele de inactivare prin căldură sugerează, de asemenea, cel puțin trei componente cu termo-

stabilități diferite, din care componenta neuronală ar fi cea mai termostabilă. În același sens pledează și sensibilitatea diferită față de inhibitori a formelor neuronale față de cele extraneuronale. Există însă actualmente și dovezi directe ale existenței MAO sub forme moleculare multiple [141], evidențiate și separate electroforetic. Remarcabil faptul că există izoenzime ale MAO care migrează spre catod, ceea ce presupune a fi purtătoarele unor sarcini pozitive, așa cum alte forme care migrează spre anod, respectiv, purtătoare de sarcini negative. Mai mult, forma care migrează spre catod este insensibilă la inhibitorii de tip hidrazinic și este inhibată de structuri nehidrazinice de tipul trancilprominei [141].

Deși toate aceste date, alături de altele de acest tip, obținute *in vitro*, pledează pentru existența unor forme moleculare multiple ale MAO, condițiile pe care le impune acest experiment și mai ales dizlocarea enzimei din legăturile sale cu structurile membranei mitocondriale ridică problema în ce măsură aceste date sînt extrapolabile la condițiile *in vivo*.

Pot constitui substraturi pentru MAO, amine de tipul dopaminei, tiraminei, 5-hidroxitriptaminei, noradrenalinei, adrenalinei. Enzima oxidează amine primare, secundare sau terțiare, grupul aminic putînd fi legat de un grup metilenic nesubstituit [126].

Un al doilea substrat pentru MAO îl constituie oxigenul, enzima fiind puțin sensibilă la variațiile locale fiziologice ale concentrației oxigenului [126].

Procesul de oxidare al catecolaminelor, catalizat de MAO, se poate realiza asupra aminelor ca atare sau după prealabilă metilare catalizată de COMT [126]. MAO cu localizare neuronală oxidează o parte din catecolaminele recaptate, proces favorizat de substanțele blocante ale depozitării intraveziculare. Prezența și funcția MAO neuronale permit realizarea unui echilibru între procesele de transport transmembranar al catecolaminelor, concentrația liberă citoplasmică a acestora și depozitarea lor în vezicule, fapt indirect demonstrat prin administrarea de inhibitori de MAO. Mai mult, s-a putut demonstra [12] că în menținerea cvasi constantă a catecolaminelor tisulare, chiar în condițiile unei creșteri intense a activității sistemului simpatic, MAO are o funcție esențială. Astfel creșterea activității simpatice generează mai multe modificări din care două aproape concomitent: o creștere imediată a ratei

de sinteză a catecolaminelor prin anularea inhibiției tirozin-hidroxilazei de către produsul final, creșterea instantanee a recaptării NA eliberate precum și o scădere semnificativă, relativ mai tîrzie a activității MAO. MAO cu localizare postsinaptică este probabil implicată în inactivarea enzimatică a catecolaminelor captate extraneuronal.

Dezaminarea oxidativă a CA catalizată de către MAO duce la formarea aldehidei acidului 3,4-dihidroximandelic care se oxidează mai departe cu formarea de acid 3,4-dihidroximandelic sau se reduce formînd 3,4-dihidroxifenilglicol. Ultimii doi compuși au putut fi puși în evidență atît tisular cît și ca produși de eliminare la nivel urinar.

4.7.1.1. Inhibitorii monoamin-oxidazei

Din punct de vedere structural inhibitorii de MAO pot fi încadrați în două grupe: compuși cu structură hidrazinică (hidrazidică) și compuși nehidrazinici. În fig. 4.6 sînt prezentați cîțiva dintre cei mai cunoscuți inhibitori ai MAO. Compușii cu structură hidrazinică nu sînt în totalitatea lor caracterizați de proprietăți blocante ale MAO. Așa de exemplu hidrazina ca atare

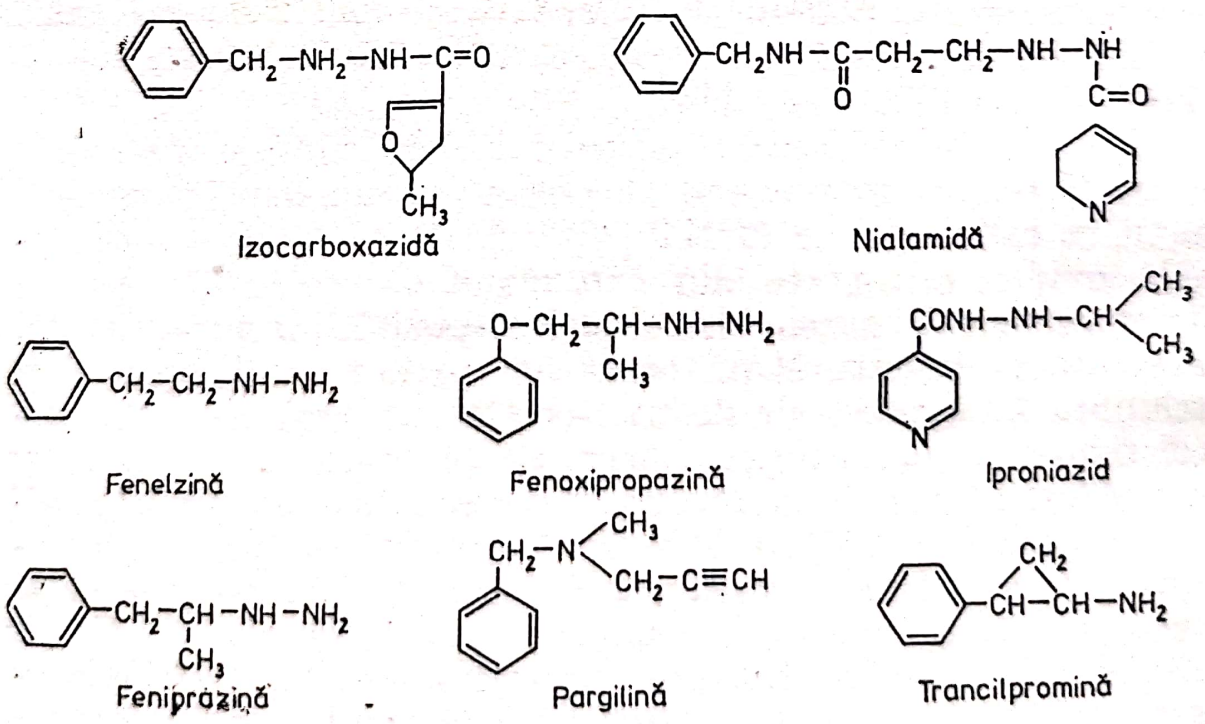


Fig. 4.6. Structurile chimice ale unor inhibitori ai monoamin-oxidazei

sau metilhidrazina sînt practic lipsite de efecte inhibitorii, în timp ce adiția unui grup alchil de 2 pînă la 8 atomi de carbon le conferă proprietăți inhibitorii marcate. Acest tip de compuși se încadrează în grupul alchilhidrazinelor. Substituirea cu alte grupări permite obținerea de aminoalchilhidrazine sau aralchilhidrazine [13]. Aralchilhidrazinele constituie un grup de compuși cu eficiență inhibitorie față de MAO dintre cele mai remarcabile.

Compușii cu structură hidrazidică prezintă un interes deosebit prin caracteristicile lor chimice și farmacologice, fiind inactivi ca atare dar fiind supuse în organism unui proces de bioactivare prin îndepărtarea metabolică a moleculei transportoare și eliberarea componentului activ la nivelul organului țintă. Inhibitorii cu structura hidrazinică sau hidrazidică inhibă MAO într-o manieră ireversibilă. Această inhibiție este dependentă de oxigen și este intensificată de prezența cianurii. Se admite existența mai multor etape implicate în procesul de inhibiție prin compușii de tipul menționat. Remarcabil este procesul de conversie, prin oxidare enzimatică, al unor hidrazine sau hidrazide în compuși cu potență inhibitorie superioară compușilor de origine. Hidrazinele competiționează cu substratul pentru centrul activ al enzimei. Etapa inițială ar consta în reducerea componentului flavinic al MAO [97]. În fapt, oxidarea unui compus hidrazinic cu formarea diazinei corespunzătoare poate fi tratată într-o manieră asemănătoare cu interacția enzimă-substrat:

$$RNH\text{-}NH_2 + O_2 \xrightarrow{MAO} RN = NH + H_2O_2.$$

Reacția de fapt se petrece în două etape, prima fiind reprezentată de interacția compusului cu flavoenzima (MAO), rezultînd compusul diazenic și flavoenzima redusă care, subsecvent, în prezența O_2, se oxidează generînd H_2O_2.

Compusul diazenic este un inhibitor foarte puternic interacționînd aproape instantaneu cu MAO chiar la temperaturi mai scăzute (10—12 grade centigrade) în timp ce inactivarea prin compuși hidrazinici este mult mai lentă. Se sugerează [97] că oxidarea inițială a hidrazinei și formarea diazenei este o etapă determinantă de viteză a întregului proces inhibitor, etapele următoare, respectiv reoxidarea enzimei reduse și interacția diazenei cu forma oxidată, producîndu-se rapid.

Compușii nehidrazinici, cu structuri diferite, de tipul trancilprominei sau pargilinei sînt blocanți eficienți ai MAO frecvent utilizați în terapeutică.

Ireversibilitatea reacției de inhibare a MAO prin compuși de tipul menționat pune problema mecanismului refacerii activității enzimatice după administrarea inhibitorului. Refacerea este independentă de structura inhibitorului ireversibil folosit dar depinde de organul în care se măsoară activitatea MAO [100], refacerea activității enzimatice fiind realizată exclusiv prin neosinteză. În fapt, această neosinteză a MAO se realizează cu o viteză ce reflectă *turnover*-ul sintezei proteice, viteza fiind implicit specifică pentru organul considerat. Normalizarea valorilor MAO inhibate se realizează în cîteva zile de la administrarea inhibitorului și poate fi întîrziată de către inhibitorii sintezei de proteine de tipul puromicinei sau cicloheximidei [100].

Derivații hidrazinici necesită o perioadă de timp pentru a realiza un maxim de inhibiție, perioadă dependentă de particularitățile structurale ale compusului respectiv. Inhibiția MAO duce la creșterea concentrației tisulare de CA și serotonină la diferite nivele, proces de asemenea lent și corelat cu mărimea inhibiției enzimatice respective.

Un număr de alte sisteme enzimatice sînt de asemenea inhibate de către compușii hidrazinici. Printre acestea pot fi enumerate diamin-oxidaza, enzime de tipul aminoacid-decarboxilazelor, transaminazelor, dehidrazelor (care au drept coenzimă piridoxal-5-fosfatul) etc. Excreția aminelor biogene este însă diferit modificată de către inhibitorii MAO (tabel III).

TABELUL III

Efectele inhibitorilor de MAO asupra excreției unor amine biogene

Excreție crescută	*Excreție nemodificată*
Normetadrenalina	Noradrenalina
Triptamina	Dopamina
p-Tiramina	Histamina
o-Tiramina	Serotonina
m-Tiramina	
Fenetilamina	
Sinefrina	
Norsinefrina	

Scanned with OKEN Scanner

Consecințele farmacologice ale inhibiției MAO, implicit ale creșterii concentrației CA și serotoninei în diferite țesuturi, inclusiv în SNC, prezintă deosebit interes pentru diverse domenii ale terapeuticii. Efectele antidepresive sînt corelate în bună măsură cu creșterea concentrației CA cerebrale, efectele hipotensive cu apariția de falși transmițători de tipul octopaminei, efectele antianginoase pot fi de asemenea, în parte, consecința acestui mecanism. Alte efecte ale compușilor hidrazinici necorelate cu inhibiția MAO sînt cele de tip simpatomimetic, efecte cronotrope și inotrope pozitive, bloc reversibil al transmisiei neuro-musculare, efecte antiinflamatorii etc. [13].

Prezintă un deosebit interes efectele inhibitorilor de MAO asupra captării NA. Așa, de exemplu, pretratamentul cu pargilină abolește aparent capacitatea de depozitare în veziculele de depozit. Acest efect este potențat de rezerpină. Creșterea concentrației NA libere citoplasmice, secundare inhibiției MAO, reduce captarea transmembranară a NA circulante. Blocajul MAO poate avea drept consecință o creștere lentă a răspunsului organelor cu inervație adrenergică la CA [130]. Acest fenomen este demonstrat pentru NA, adrenalină și fenilefrină, care constituie substraturi pentru MAO, dar nu și pentru substanțele care nu realizează această condiție, cum e cazul metoxaminei. Sensibilizarea la CA a membranei nictitante izolate [130] este mai marcată după pretratamentul cu pargilină decît după rezerpină iar asocierea acestor doi agenți produce o sensibilizare echivalentă cu cea generată prin denervare. Pretratamentul cu pargilină nu modifică însă sensibilitatea preparatelor denervate, ceea ce sugerează că MAO extraneuronală nu este implicată în fenomenele de sensibilizare descrise.

4.7.2. *Catecol-O-metil-transferaza*

O altă modalitate enzimatică de inactivare a CA se realizează în contextul unei reacții de transfer de metil. Această reacție este catalizată de COMT, reacție cu două substraturi, în care *S*-adenozil-metionina (SAM) este donatorul de metil (fig. 4.7). COMT are o funcție majoră în degradarea enzimatică a CA circulante (7) (vezi și fig. 4.5). Localizarea sa este preponderent extraneuronală deși există fapte experimentale care pledează pentru existența enzimei în cantități semnificative și în nervii

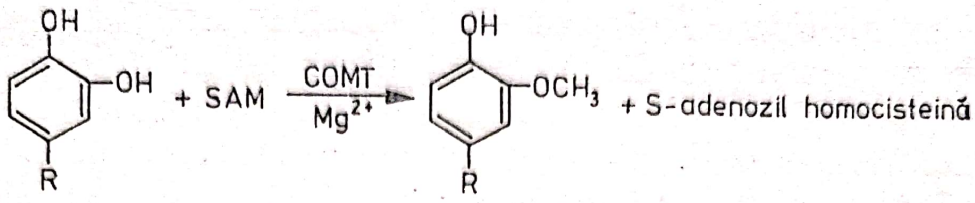


Fig. 4.7. Interacția COMT — catecolamine

adrenergici [6]. COMT este o enzimă metal-dependentă, fiind activă în prezența Mg dar și a Mn, Zn, Co, Fe, dar nu și în prezența Ca sau altor cationi bivalenți. Enzima este inactivată de inhibitori ai grupărilor tiolice de tip acid monoiod-acetic sau paraclormercuribenzoat. Greutatea moleculară a enzimei a fost estimată în jur de 25 000 daltoni. COMT este distribuită în aproape toate țesuturile la mamifere, concentrațiile cele mai mari fiind găsite la nivelul ficatului. Au fost puse în evidență forme moleculare izoenzimatice în diferite țesuturi sau chiar la nivelul aceluiași țesut. În mecanismul său de acțiune este implicată formarea unui complex cuaternar între enzimă, cele două substraturi și cofactorul metalic [39]. Compușii *O*-metilați sînt componenții principali rezultați din catabolismul CA, eliminați pe cale urinară. Astfel normetadrenalina, metadrenalina, rezultate din metilarea NA și respectiv a A sînt relativ inactive, rezultînd astfel că *O*-metilarea este o modalitate eficientă de inactivare și de întrerupere a acțiunii CA. Acidul vanilmandelic poate rezulta de asemenea dintr-o secvență de reacții începînd cu *O*-metilarea, dezaminare subsecventă (MAO) sau dezaminare inițială urmată de *O*-metilare [69].

4.7.2.1. Inhibitorii COMT

Inhibiția COMT se poate realiza prin interferență cu diverși factori coparticipanți la reacția de metilare. Astfel, inhibitori pot fi compușii izosteri ai CA analogi ai produsului de reacție (difenoli *O*-metilați), derivați ai *S*-adenozilmetioninei sau *S*-adenozilhomocisteinei, precum și Ca care acționează ca antagonist al Mg [39]. Dintre inhibitorii competitivi sau necompetitivi amintim: 3-hidroxi-4-pirona, 3-hidroxi-4-piridona, tropolonul, pirocatecolul, pirogalolul etc. Utilizarea diverșilor inhibitori ai COMT în anumite condiții experimentale a permis evidențierea unei creșteri a sensibilității organelor efectorii la adminis-

trarea de CA [129]. S-a putut pune în evidență pe membrană nictitantă de pisică o corelație netă între eficiența CA și gradul de sensibilizare prin inhibitorii de COMT. Se admite că sensibilizarea la CA prin inhibitorii de COMT este evidentă pentru agoniștii adrenergici care nu sînt supuși captării și care au o eficiență crescută la nivelul țesutului respectiv. COMT are o contribuție esențială în menținerea gradientului înalt de concentrație în terminațiile adrenergice chiar dacă țesutul respectiv a fost denervat sau supus tratamentului cu cocaină. Astfel sensibilizarea prin cocaină sau denervare este parțial mascată de COMT și crescută în prezența inhibitorilor enzimei respective. Așa de exemplu blocarea mecanismului de captare neuronală crește de 100 ori sensibilitatea la NA în prezența inhibitorului de COMT, 3′, 4′-dihidroxi-2-metilpropiofenonă și de numai 20 ori în absența inhibitorului [129].

În schimb pentru izoprenalină care nu este supusă captării neuronale nu se observă nici o modificare a sensibilității prin denervare atît în prezența inhibitorului de COMT cît și în absența acestuia. Blocajul duce de asemenea și la creșterea intensă a acumulării extraneuronale de CA, chiar la concentrații scăzute de amine.

BIBLIOGRAFIE

1. H. Aberg, L. Wetterberg, S. B. Ross, Ö. Fröden, *Acta Med. Scand.* **196**, 17 (1974).
2. E. T. Angelakos, *Circul. Res.*, **16**, 39 (1965).
3. L. Angelucci, M. Baldieri, M. Buonerba, *Nature*, **214**, 5084 (1967).
4. M. J. Antonaccio, C. B. Smith, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, **188**, 654 (1974).
5. E. J. Ariëns, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **139**, 606 (1967).
6. A. Arnold, *Il Farmaco*, **27**, 79 (1972).
7. J. Axelrod, *Pharmacol. Rev.*, **18**, 95 (1966).
8. J. Axelrod, *J. Biol. Chem.*, **237**, 1657 (1962).
9. U. Banerjee, G. S. Lin, *Neuropharmacology*, **12**, 917 (1973).
10. A. L. Bassett, H. Gelband, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, **188**, 157 (1974).
11. B. G. Benfey, *Br. J. Pharmacol.*, **48**, 132 (1973).
12. B. Bhagat, T. Dave, Y. C. Lee, R. J. Bryan, *Amer. J. Physiol.*, **224**, 46 (1973).

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 5

INTERRELAȚIILE FARMACOLOGICE ALE SISTEMULUI AMP CICLIC

Deși de la descrierea adenozinmonofosfatului ciclic (165, 166) au trecut mai puțin de 20 ani, importanța sa în biologie și medicină a declanșat creșterea logaritmică a numărului publicațiilor în acest domeniu (78). Au putut fi puse în evidență funcțiile complexe ale AMP ciclic în reglarea și controlul proceselor intracelulare, conturîndu-se din ce în ce mai net funcția sa de „mesager secund" (168, 169), intracelular. Dată fiind complexitatea funcțiilor sale în realizarea răspunsului celular la stimuli: hormonali, nervos, chimic, imunologic etc., precum și în controlul, specificitatea și amplificarea acestui răspuns, este axiomatic admisibilă implicația sistemului AMP ciclic în răspunsul farmacologic.

5.1. Sistemul AMP ciclic

5.1.1. *AMP ciclic*

Adenozinmonofosfatul ciclic (*c*AMP) a putut fi identificat în celulele provenite dintr-o mare diversitate de organe. În sistemele biologice AMP ciclic rezultă din ATP sub acțiunea catalitică a adenilat-ciclazei.

AMP ciclic este implicat ca intermediar intracelular în acțiunea unor diverși hormoni [169) în secreția exocrină și endocrină, în transmisia sinaptică, în eliberarea mediatorilor, în contracția și relaxarea musculară, în funcția renală, în lipoliză, în sinteza proteică, steroidogeneză [78] etc. (tabelul I).

Scanned with OKEN Scanner

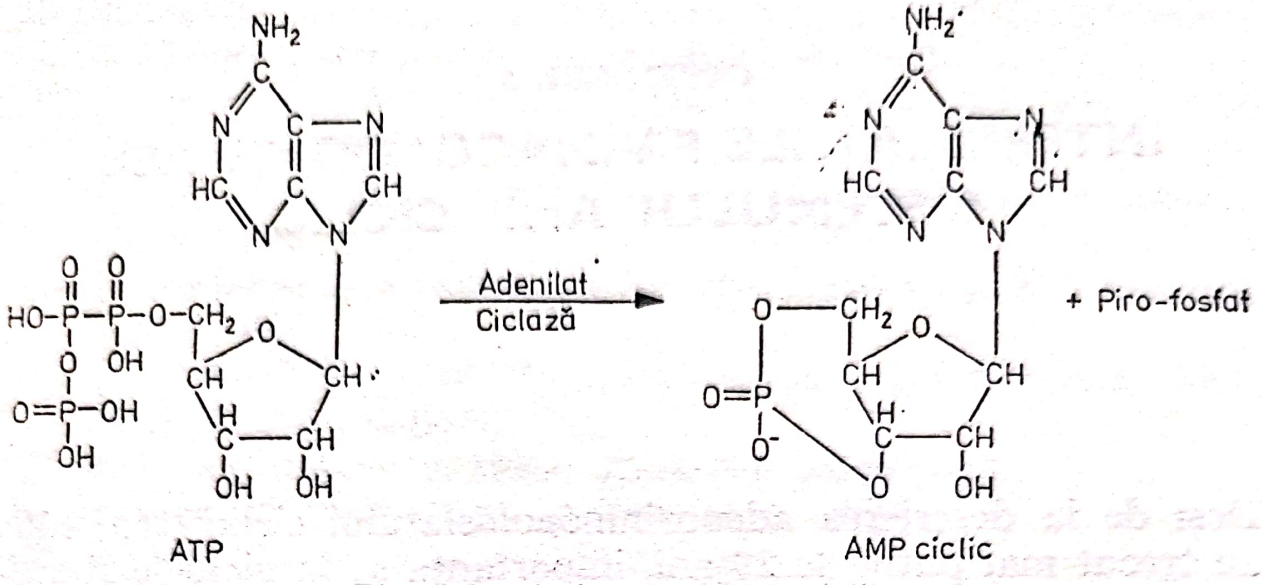


Fig. 5.1. Biosinteza AMP ciclic

TABELUL I

Corelaţia AMP ciclic cu răspunsul structurilor morfo-funcţionale la stimuli adecvaţi

Stimulul	*Structura morfo-funcţională*	*Efect*	*Variaţia cAMP*
Factor de eliberare a hormonului de creştere	Hipofiză anterioară	Eliberarea hormonului somatotrop	Creştere
Factor de eliberare a hormonului luteinizant	”	Eliberarea hormonului luteinizant	Creştere
Electric	Hipofiză posterioară	Eliberarea vasopresinei	Creştere
Glucoză	Beta-celulele pancreatice	Eliberarea insulinei	Creştere
ACTH	Corticosuprarenală	Eliberarea hormonilor corticoizi	Creştere
Hormon tireotrop	Tiroidă	Eliberarea tiroxinei	Creştere
Adrenalină	Inimă	Glicogenoliză, inotrop pozitiv	Creştere
Adrenalină	Adipocite	Lipoliză	Creştere
Electric	Sinapsă	Eliberare mediator	Creştere
Electric	Joncţiune neuro-musculară	Eliberare de acetilcolină	Creştere

Au fost stabilite de asemenea corelații importante ale diverselor procese patologice ca hipertensiunea arterială [4, 61, 88], anafilaxia [146], perturbarea diviziunii celulare [10, 24] afecțiunile musculare [103] cu variații cantitative ale *c*AMP

În conceptul celui de al doilea mesager dezvoltat de Sutherland și col. [168, 169], AMP ciclic crește cantitativ intracelular, ca urmare a interacțiunii unui stimul extern, specific — primul mesager — cu un receptor membranar sau cu însuși adenilat-ciclaza. Această creștere intracelulară a celui de al doilea mesager duce evident la o diversitate remarcabilă de răspunsuri fiziologice. Aceasta ridică problema specificității acțiunii AMP ciclic într-un anumit tip de celulă. Primul grad de specificitate ține de interacțiunea primului mesager cu un receptor specific sau, posibil, cu adenilat-ciclaza. Al doilea ordin de specificitate ține de caracterele morfofuncționale, de diferențierea funcțională a însăși efectorului. Așa, de exemplu, catecolaminele pot produce relaxarea sau contracția musculaturii netede, creșterea forței de contracție a miocardului, lipoliză, glicogenoliză etc., pe structuri apte de un asemenea comportament funcțional. Toate aceste fenomene sînt însă corelate pozitiv, calitativ, cantitativ și temporal cu activitatea adenilat-ciclazei și creșterea cantității de *c*AMP. Această corelație a putut fi demonstrată arătîndu-se că *c*AMP [169] crește, de exemplu, în inimă, ca urmare a stimulării cu adrenalină, de patru ori într-un interval de 3 secunde, creștere suficient de rapidă pentru a fi corelabilă cu creșterea forței de contracție (fig. 5.2).

Dacă formarea AMP ciclic este catalizată de adenilat-ciclază, distrucția sa este realizată de o altă enzimă, *c*AMP-fosfo-diesteraza, considerată a controla singurul mecanism de inactivare fiziologică a nucleotidului ciclic. Modificarea într-un sens sau altul, prin mijloace farmacologice, a verigilor ce duc la geneza sau inactivarea *c*AMP a fost demonstrată ca stînd la baza unor numeroase și diverse răspunsuri farmacodinamice (fig. 5.3). Nivelul intracelular al AMP ciclic în diferite țesuturi, în absența stimulării prin diferiți hormoni, este comparabil, fiind de ordinul 0,1—0,5 mM/g țesut umed. Admițînd o distribuție uniformă în apa intracelulară, concentrația AMP ciclic ar fi de 10^{-7}—10^{-6} M, adică cu 2—4 ordine de mărime inferioară concentrației altor nucleotizi adenilici. De remarcat faptul că în urma stimulării hormonale, nivelul maxim al AMP ciclic variază net în diferite tipuri de celule.

Scanned with OKEN Scanner

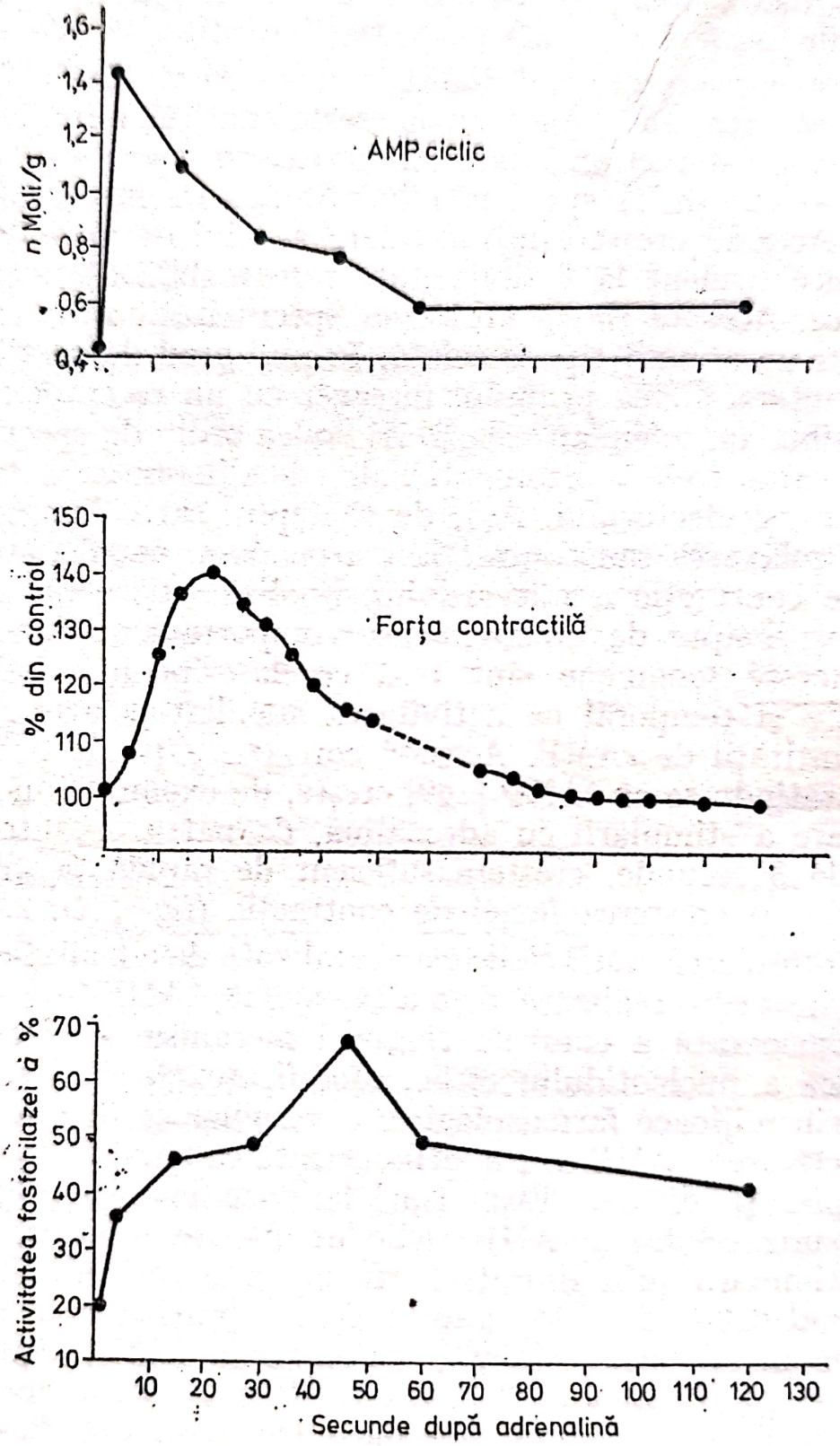


Fig. 5.2. Efectele unei doze de adrenalină asupra AMP ciclic, forţei contractile şi fosforilazei *a* în inima izolată de şobolan

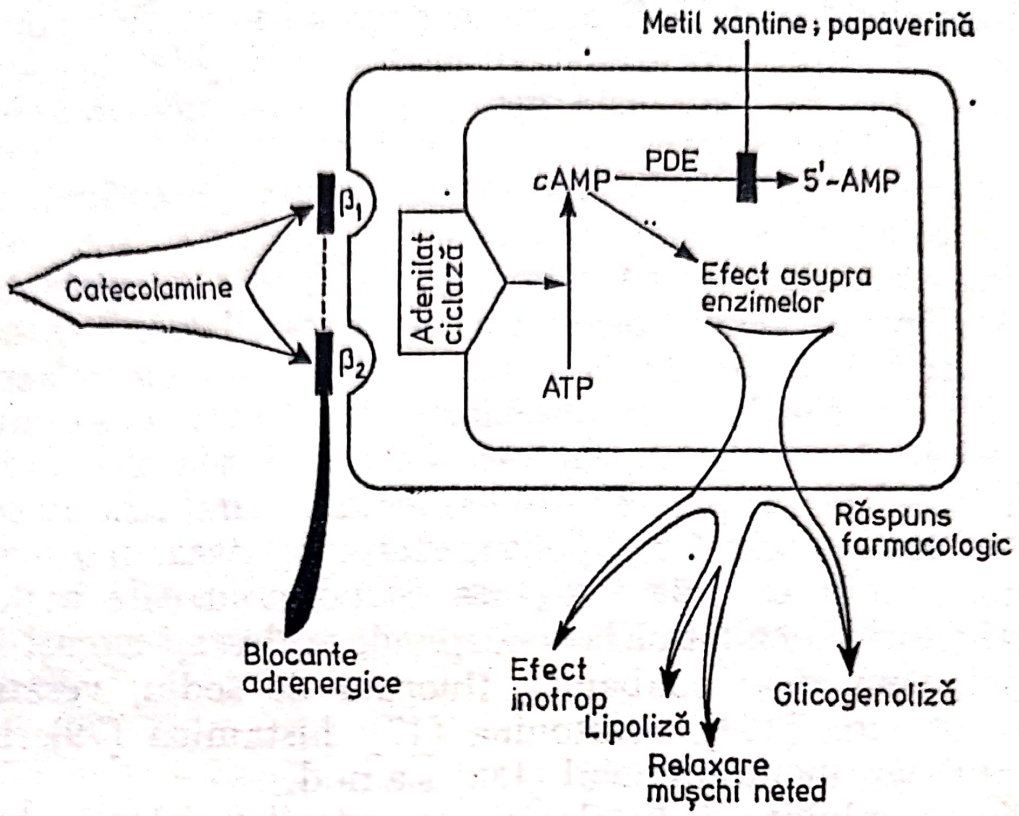


Fig. 5.3. Unele corelații farmacologice ale sistemului AMP ciclic

5.1.2. *Adenilat-ciclaza*

Adenilat-ciclaza catalizează formarea 3',5'-adenozinmonofosfatului ciclic din ATP. Enzima este un component al structurilor membranare celulare, cu o largă distribuție, fiind pusă în evidență la bacterii, plante și animale. În anumite țesuturi adenilat-ciclaza a fost găsită fie asociată membranei citoplasmatice, în ficat, rinichi, țesut adipos, fie în mitocondrii ca în cortexul cerebral, mușchiul striat, ori în reticulul sarcoplasmic din mușchiul cardiac. Localizarea citochimică a adenilat-ciclazei în membrana celulară, coroborată cu datele biochimice, evidențiază faptul că în reacția catalizată de adenilat-ciclază produsele de reacție sînt eliberate în direcții opuse, respectiv AMP ciclic înspre interiorul celulei în timp ce pirofosfatul în afara membranei plasmatice [136]. Date suplimentare obținute pe fantome eritrocitare umane [81] evidențiază faptul că AMP ciclic este legat exclusiv de suprafața citoplasmatică a membranei respective.

Enzima își păstrează proprietățile în hematiile hemolizate și în fragmente mari de membrană. Formele solubilizate își

pierd capacitatea de a fi activate prin hormoni dar pot fi activate încă prin fluorură şi adrenalină. Proprietatea de a fi activată prin fluorură este generală pentru adenilat-ciclazele izolate din diverse ţesuturi de mamifer.

Enzima activată prin fluorură nu poate fi activată suplimentar prin hormoni specifici.

Incubarea cu tripsină a membranelor de hematii aboleşte activarea prin diferiţi hormoni a adenilat-ciclazei.

Un mare număr de hormoni exercită un efect activator sau inhibitor asupra adenilat-ciclazei. Acest efect reprezintă una din verigile importante prin care hormonii, via sistemul AMP ciclic, controlează procese fundamentale cum sînt glicogenoliza, sinteza proteinelor, lipoliza, steroidogeneza, morfogeneza.

În afară de o largă varietate de hormoni care acţionează ca activatori, adenilat-ciclaza răspunde la diverşi agenţi farmacologici, cum sînt: ouabauna, fluorura de sodiu, veratridina, batrachotoxina [154], serotonina [17], histamina [79], izoproterenolul sau metaraminolul [188] ş.a.m.d.

Dintre inhibitorii fiziologici ai adenilat-ciclazei insulina este cunoscută că inhibă activitatea adenilat-ciclazei din ficat iar protaglandina E_1 pe cea din adipocite. Adenilat-ciclaza din diferite surse tisulare are sensibilitate diferită atît faţă de activatori cît şi faţă de inhibitori. Aşa, de exemplu, adenilat ciclaza din celulele parenchimale hepatice este mai sensibilă la izoproterenol iar cea din celulele reticuloendoteliale la glucagon. Aceasta pledează pentru heterogenitatea adenilat-ciclazei la nivelul diferitelor tipuri de celule [136].

De remarcat că insulina, deşi în concentraţii mici (5μM/ml), inhibă direct adenilat-ciclaza, precum şi activarea prin adrenalină sau glucagon, la concentraţii de 100 ori mai mari însă intensifică activarea atît direct cît şi prin hormonii menţionaţi [73].

Diferite substanţe medicamentoase aparţinînd unor grupe farmacodinamice diferite dar avînd puternică acţiune antilipolitică, cum sînt: efedrina, clorfentermina, dextroamfetamina, flufenazina, trancilpromina, metoxifenamina şi altele inhibă intens stimularea prin izoproterenol a adenilat-ciclazei [188]. În afară de funcţia actualmente binecunoscută a adenilat-ciclazei de a prelua informaţia transmisă de efectorii alosterici sau primul mesager se acumulează date care subliniază funcţia enzimei în reglarea secreţiei hormonului paratiroid [1], medierea

acțiunii antidiuretice a vasopresinei, transmisia sinaptică centrală și periferică.

Activarea adenilat-ciclazei prin hormoni este considerată consecința interacțiunii alosterice a hormonului cu enzima sau cu membrana cu care-i asociată [138]. Pe baza unor analogii și a unor date experimentale originale Najjar și Constantopoulos [115] propun un mecanism de activare a adenilat-ciclazei prin hormoni și fluorură, admițînd existența enzimei în două stări — inactivă fosforilată și starea activă defosforilată. Grupul fosfat poate fi monoesterul unui reziduu acid aminat al enzimei. Hormonul sau fluorura interacționează cu fosfo-adenilat-ciclaza, realizînd o deplasare nucleofilică a grupului fosforil și activînd astfel enzima. Inactivarea adenilat-ciclazei s-ar realiz. prin refosforilare catalizată de proteinkinaza, *c*AMP dependentă, demonstrată prin incubarea enzimei active într-un sistem fosforilant.

5.1.3. *Fosfo-diesteraza*

Fosfo-diesteraza este considerată în limitele cunoștințelor actuale singurul mecanism fiziologic de limitare a duratei și mărimii acțiunii *c*AMP și *c*GMP (guanozinmonofosfatul ciclic), fenomen realizat prin scindarea legăturii 3′-*O*-fosfat cu formarea de 5′-AMP și 5-GMP inactivi. Enzima este mai larg distribuită în diferite țesuturi în comparație cu adenilat-ciclaza și este evidențiată atît în stare solubilă cît și legată de anumite structuri.

Fosfo-diesteraza există în diferite forme moleculare [31, 112], evidențiindu-se electroforetic, de exemplu în homogenatul de creier de șobolan 4 componente iar în cerebel [178] 6 fracțiuni distincte, forme existente probabil în tipuri celulare diferite. Alți autori au sugerat însă existența a mai multe forme de fosfo-diesterază într-un singur tip de celulă [25]. Date numeroase evidențiază existența, în cele mai multe țesuturi investigate, a două forme moleculare, respectiv o formă cu afinitate ridicată pentru AMP ciclic și greutate moleculară mică și alta cu afinitate scăzută [62, 127, 174] și greutate moleculară mare. Prima fracțiune hidrolizează atît *c*AMP cît și *c*GMP, iar fracțiunea secundă nu hidrolizează deloc *c*GMP.

După purificare, fosfodiesteraza cerebrală și din alte țesuturi [32] devine inactivă datorită îndepărtării unui activator

proteic, termostabil. S-a arătat de asemenea [187] că AMP ciclic activează lent fosfo-diesteraza cardiacă probabil prin creşterea interacţiei dintre enzimă şi activator. Activitatea fosfo-diesterazei este stimulată în prezenţa unei concentraţii micromolare de ioni de calciu şi a unei concentraţii de 3mM de Mg^{2+}. Activatorul proteic sau modulatorul ar avea efect specific, legînd forma inactivă a „fosfo-diesterazei Ca^{2+} — Mg^{2+} dependente" [8, 173], complex căruia Ca^{2+} îi modifică echilibrul, permiţînd formarea complexului enzimă activă-modulator.

[Enzimă] inactivă + modulator + Ca^{2+} $\rightleftharpoons$ [Enzimă.modulator.Ca^{2+}] activă.

Substanţe diferite modifică într-un sens sau altul activitatea fosfo-diesterazei (Tabelul II). Dintre stimulatori amintim insulina

TABELUL II

Efectele unor substanţe farmacodinamic active asupra fosfo-diesterazei (in vitro) [188]

Substanţa activă	*I_{50}-Fosfo-diesteraza din creier de şobolan* (μM)	*I_{50}-Fosfo-diesteraza din inimă de pisică* (μM)
Prometazină	360	> 100
Rezerpină	170	280
Clorpromazină	230	180
Tioridazină	180	90
Papaverină	6	2
Bradichinină	> 50	> 100
Izoproterenol	720	> 1000
Efedrină	> 1000	> 100
Dipiridamol	4	25
Oxitocină	> 7	> 7
Pilocarpină	> 100	> 100
Indometacin	92	90
Lidocaină	> 100	> 100
Neostigmină	> 1000	> 1000
Teofilină	120	50

şi imidazolul iar dintre inhibitori, înafară de metilxantine şi papaverină, un mare număr de substanţe farmacologice cu structură fenotiazinică, antidepresive triciclice, benzodiazepine [13], cardiotonice, corticoizi, hormoni androgeni, hormoni tiroidieni [188] etc. În majoritatea cazurilor s-au putut stabili corelaţii între inhibiţia fosfo-diesterazei şi efectele farmacodinamice ale substanţelor respective.

5.2. AMP ciclic şi transmisia sinaptică

5.2.1. *Transmisia sinaptică centrală şi ganglionară*

Adenozinmonofosfatul ciclic şi enzimele adenilat-ciclază şi fosfo-diesteraza au putut fi puse în evidenţă la diferite nivele în S.N.C. şi periferic [19, 37, 49], fapt ce sugerează, per se, implicaţia funcţională a sistemului AMP ciclic în procesele fundamentale de la aceste nivele. În conceptul de bază se admite că neurohormonii (neurotransmiţătorii) [165, 166, 168, 169] interacţionează cu receptorii membranari, generînd stimularea adenilat-ciclazei, în timp ce stimularea electrică acţionează indirect prin intermediul eliberării de adenozină. După Rall [134], adenozina stimulează adenilat-ciclaza prin interacţie cu un receptor membranar specific, creşterea *c*AMP fiind însă blocată de teofilină, prin blocarea probabilă a receptorului menţionat, spre deosebire de potenţarea realizată de aceasta în majoritatea sistemelor.

Dopamina [57, 104] produce şi hiperpolarizarea neuronilor postganglionari, concomitent cu creşterea remarcabilă a *c*AMP, efecte blocate de agenţi α-adrenolitici. *c*AMP ar media efectele dopaminei în neuronii postganglionari, fiind responsabil de potenţialul lent postsinaptic inhibitor.

Într-adevăr, *c*AMP hiperpolarizează neuronii postganglionari ca şi monobutiril-*c*AMP şi dibutiril-*c*AMP, fenomen ce poate fi potenţat de teofilină.

Stimularea electrică a fibrei preganglionare duce la o creştere netă a conţinutului de *c*AMP, fenomen corelat cu procesul de transmisie sinaptică şi nu cu fenomenele de conducere axonală [57]. Mai mult, au fost stabilite corelaţii între fenomenele de transmisie sinaptică ganglionară, interacţiunea acetilcolinei

cu membrana postsinaptică și creșterea cAMP, demonstrîndu-se că un blocant al receptorilor nicotinici ganglionari (hexametoniu) asociat cu un blocant al receptorilor muscarinici (atropina) previn creșterea *c*AMP, secundară stimulării electrice. Activarea receptorilor muscarinici de la nivelul interneuronilor dopaminergici ar declanșa secvența de fenomene (via dopamina eliberată) ce duce la creșterea *c*AMP, și hiperpolarizare [57]. Adenilat-ciclaza ganglionară dopamin-activată este distinctă de adenilat-ciclazele descrise în alte țesuturi, care manifestă proprietăți de receptor β-adrenergic și asupra cărora popamina nu are efecte semnificative.

Numeroase alte substanțe neurotransmițătoare își realizează efectul prin intermediul *c*AMP.

Adenilat-ciclaze sensibile la noradrenalină și dopamină au fost descrise în diferite structuri nervoase la diferite specii de mamifere [26, 33] precum și creșterea producerii de AMP ciclic în țesutul cerebral prin diferite amine biogene [79, 80]. Adenilat ciclaza din fracțiunea mitocondrială de cortex cerebral este activată intens la concentrații joase de noradrenalină și dopamină. Analiza acestui efect prin utilizarea de substanțe blocante adrenergice a permis distincția unor receptori adenilat ciclazici diferiți pentru noradrenalină și dopamină în preparatele mitocondriale din cortexul cerebral de șobolan [70]. Noradrenalina, histamina și serotonina în concentrații de $1 \cdot 10^{-4}$ M incubate cu probe de țesut cerebral de om [51] produc o variație diferențiată după regiunea din creier din care s-a efectuat recoltarea. Rezultă că noradrenalina activează adenilat ciclaza din cortexul cerebral și cerebelos în timp ce histamina și serotonina nu stimulează deloc formarea de *c*AMP în cortexul cerebral uman.

În ceea ce privește transmisia centrală și ganglionară colinergică s-a evidențiat că acetilcolina crește cantitatea de guanozin-3′5′-monofosfat ciclic, un alt nucleotid natural atît la nivelul creierului cît și la nivel ganglionar [52, 57]. GMP ciclic, în concentrații scăzute, produce la nivelul neuronilor postganglionari o hiperpolarizare tranzitorie urmată de depolarizare [104]. Creșterea GMP ciclic ganglionar, ca urmare a stimulării cu agoniști colinergici, este blocată de antagoniști muscarinici de tipul atropinei [57]. Un alt neurotransmițător, octopamina, s-a dovedit un activator puternic al adenilat-ciclazei ganglionare la *Periplaneta Americana* [118]. Octopamina în aceste condiții are efecte

aditive cu dopamina şi serotonina utilizate în concentraţii diferite. Fentolamina, un α-adrenoblocant, inhibă activarea adenilat ciclazei prin octopamină în timp ce β-adrenoblocantele nu influenţează semnificativ acest proces.

5.2.2. *AMP ciclic şi substanţele farmacodinamic active neuro-psihotrope*

Dată fiind implicaţia sistemului AMP ciclic în reglarea proceselor celulare din SNC [134], respectiv în reglarea fluxului ionic transmembranar, a metabolismului glicogenului, a secreţiei neuronale, în transmisia sinaptică, în sinteza proteinelor etc., este implicit importantă stabilirea corelaţiilor între efectele specifice ale medicamentelor neuro-psihotrope şi variaţiile AMP ciclici În acest sens datele actuale nu sînt în întregime concordante. Astfel s-a arătat că clorpromazina şi alţi derivaţi fenotiazinic. precum şi haloperidolul inhibă acumularea de AMP ciclic în creierul de şobolan, secundară stimulării electrice sau prin noradrenalină şi histamină [79, 123].

Determinările efectuate de Weinryb şi col. [188] privind efectul unor medicamente din clase farmacologice diferite asupra fosfo-diesterazei din creierul de şobolan evidenţiază că din cele 158 de substanţe examinate, 14 compuşi inhibă fosfo-diesteraza avînd valoarea I_{50} mai mică de 100 μM iar 11 compuşi prezintă I_{50} de aproximativ 50 μM. Dintre medicamentele neurotrope, puternici inhibitori ai fosfo-diesterazei sînt diazepamul, clordiazepoxidul, hidroxizina, rezerpina, flufenazina, şi în mai mică măsură clorpromazina, trifluopromazina, tioridazina, tiopentalul, secobarbitalul etc.

Compusul SQ 20.009 respectiv esterul etilic al acidului 1-etil-4-(izopropilidenhidrazino)-1*H*-pirazolo [3,4-b]piridin-5-carboxilic este de 60 de ori mai activ inhibitor al fosfo-diesterazei din creierul de şobolan decît teofilina şi are efecte farmacologice similare cu alte tranchilizante atunci cînd este administrat la şobolani, pisici sau maimuţe. Spre deosebire de teofilină, SQ 20.009, clordiazepoxidul şi diazepamul au specificitate mai mare faţă de fosfodiesteraza din creier în comparaţie cu cea din lipocite şi inimă [13]. Aceste date sugerează existenţa unei corelaţii între efectele unor medicamente psihotrope şi capacitatea lor de a inhiba fosfodiesteraza cerebrală. S-au

demonstrat de asemenea proprietăţile anxiolitice ale dibutiril AMP ciclic şi ale metilxantinelor precum şi sinergismul aditiv al teofilinei şi clordiazepoxidului în diminuarea anxietăţii la şobolan. Antidepresivele triciclice sînt inhibitori competitivi ai fosfo-diesterazei [105—107]. Studiile efectuate *in vivo* pe şobolan de către Berndt şi Schwabe [15] demonstrează o creştere rapidă, de scurtă durată, a AMP ciclic în creier după administrarea unor neuroleptice (clorpromazina, haloperidolul), antidepresive triciclice (desipramina). De remarcat faptul că teofilina singură nu afectează semnificativ nivelul bazal al AMP ciclic în creierul de şobolan dar administrarea sa prealabil clorpromazinei blochează complet creşterea AMP ciclic.

Aceiaşi autori evidenţiază *in vitro* efectul inhibitor net al clorpromazinei asupra fosfodiesterazei ($I_{50} = 0{,}05$ mM), precum şi efectele inhibitorii semnificative ale antidepresivelor triciclice. Clorpromazina şi trifluopromazina inhibă necompetitiv fosfo-diesteraza în timp ce imipramina, amitriptilina şi desimipramina inhibă enzima prin mecanism competitiv. Efectul inhibitor al metilxantinelor asupra creşterii AMP ciclic prin medicamente psihotrope este interpretat ca o consecinţă a implicării adenozinei. În cortexul cerebral de cobai adenozina produce cea mai netă creştere a AMP ciclic. Antagonizarea acestui efect prin metilxantine poate fi diminuată sau anulată prin creşterea concentraţiei de adenozină ceea ce subliniază existenţa unui antagonism competitiv [144].

Se sugerează astfel că medicamentele psihotrope produc acumularea de adenozină extracelulară care interacţionează cu o unitate regulatoare a adenilat-ciclazei [66, 67]. Stabilirea însă a unor corelaţii cantitative între efectele specifice ale substanţelor neuropsihotrope şi variaţiile cerebrale ale AMP ciclic rămîne un obiectiv al cercetărilor ulterioare din acest domeniu.

5.3. Contracţia musculaturii striate şi miocardice

5.3.1. *AMP ciclic şi musculatura striată*

Efectele unor clase diferite de substanţe farmacodinamic active, cunoscute de vreme îndelungată, de facilitare a procesului de transmisie neuromusculară ca şi de potenţare a procesului contractil însăşi au putut fi interpretate în ultimii ani, pe baza date-

lor acumulate, drept o consecinţă a implicării sistemului AMP ciclic în aceste procese [23, 135, 164, 171, 191]. Componentele sistemului AMP ciclic au fost puse în evidenţă în muşchiul striat, adenilat-ciclaza şi fosfo-diesteraza comportîndu-se, faţă de activatorii şi inhibitorii cunoscuţi, similar cu enzimele provenite din alte ţesuturi. Sistemul *c*AMP controlează, via protein-kinază, nivelul fosforilazelor şi glicogen-sintetazei, implicit glicogenoliza musculară. Adenilat-ciclaza în muşchiul striat este preferenţial localizată la nivelul membranei sacilor laterali ai reticulului sarcoplasmic [147]. Apare astfel că enzima este distribuită în special intracelular la nivelele unde calciul este supus unor procese de eliberare şi captare asociate cu contracţia musculară.

Adenilat-ciclaza musculară este activată de către NaF şi de catecolamine, efectul acestora din urmă fiind blocat prin agenţi β-blocanţi.

Ionii de magneziu stimulează adenilat-ciclaza musculară, adrenalina scăzînd activitatea bazală a enzimei în absenţa Mg^{2+}, ceea ce sugerează necesitatea prezenţei acestui cation pentru activarea adenilat-ciclazei prin adrenalină [103]. Glucagonul, histamina şi prostaglandina E_1 nu au efecte semnificative de activare. Au fost puse în evidenţă variaţii nete ale adenilat-ciclazei în muşchiul cu afecţiuni distrofice precum şi în răspunsul enzimatic la activatorii fiziologici sau farmacologici [103].

Facilitarea transmisiei neuromusculare prin *c*AMP, DB-*c*AMP precum şi prin adrenalină, metilxantine etc., poate sugera corelaţia acestui fenomen cu creşterea concentraţiei intracelulare de *c*AMP. Acesta, la nivelul său, ar fi implicat în procesele metabolice asociate cu sinteza, depozitarea şi eliberarea acetilcolinei la terminaţiile nervoase [191]. În condiţii fiziologice, nivelul intracelular al *c*AMP în muşchiul striat este controlat şi prin intermediul aferenţelor vegetative simpatice [189].

5.3.2. *AMP ciclic şi funcţia inotropă miocardică*

Adenilat-ciclaza miocardică prezintă unele asemănări cu cea din muşchiul striat dar şi unele diferenţe semnificative. Astfel enzima miocardică este stimulată de adrenalină, noradrenalină, tiroxină, glucagon, prostaglandina E_1, histamină şi fluorură

Scanned with OKEN Scanner

[85, 97, 103]. Stimularea prin glucagon a adenilat-ciclazei miocardice se sumează cu stimularea prin catecolamine dar spre deosebire de efectul acestora din urmă, stimularea prin glucagon nu este afectată de β-blocantele adrenergice.

În condiţiile insuficienţei cardiace experimentale sau cronice creşterea după glucagon a concentraţiei *c*AMP este abolită, menţinîndu-se însă la stimularea prin catecolamine [44]. Inotropismul se modifică concordant cu variaţiile concentraţiei *c*AMP generate de glucagon sau catecolamine. În muşchiul cardiac adenilat-ciclaza este localizată în reticulul sarcoplasmic, în membrana tubilor T, în discurile intercalare şi în sarcolema [147]. În timpul activităţii spontane a inimii de broască s-a pus în evidenţă o creştere netă a *c*AMP în primele trei sferturi ale intervalului R—T al ECG, ceea ce corespunde cu faza ascendentă de pe mecanogramă. Această sincronizare pozitivă între creşterile *c*AMP şi contracţie este asociată cu o sincronizare negativă a *c*AMP, interpretată ca semnificînd funcţia antagonistă a celor doi nucleotizi [193]. Mai mult, se consideră că interacţia catecolamine — acetilcolină la nivelul miocardului este mediată de interrelaţia antagonică *c*AMP—*c*GMP [148].

Există actualmente date concludente ce evidenţiază corelaţia dintre creşterea concentraţiei intracelulare de *c*AMP (prin activarea adenilat-ciclazei sau blocarea fosfo-diesterazei) şi efectele inotrope ale unor agenţi farmacologici [89, 90, 169, 190]. Unele neconcordanţe în timp între creşterile cantitative ale *c*AMP şi creşterea forţei de contracţie a inimii s-ar datora faptului că forţa de contracţie atinge maximul său la concentraţii foarte mici de *c*AMP iar capacitatea adenilat-ciclazei de a răspunde la catecolamine şi glucagon depăşeşte atît capacitatea de răspuns a fosforilaz-*b*-kinazkinazei cît şi a sistemului contractil [64].

Argumente farmacologice numeroase au fost aduse însă în favoarea ideii că *c*AMP este mediatorul celular al efectelor inotrope al diferiţilor agenţi farmacodinamici activatori ai adenilat-ciclazei. Astfel pentru domeniul adrenergic s-a demonstrat că β-adreno-blocantele inhibă activarea adenilat-ciclazei, creşterea *c*AMP precum şi efectul inotrop pozitiv [89, 90, 97, 133]. Inhibitorii de fosfo-diesterază potenţează efectul inotrop al noradrenalinei histaminei şi izoprenalinei, în timp ce un activator de fosfo-diesterază (imidazolul) antagonizează acest efect

[90]. Mecanismul prin care în ultimă instanță *c*AMP produce creșterea forței de contracție miocardice este încă incert. Prin analogie cu efectul inotrop pozitiv al ouabainei care crește captarea intracelulară a calciului, precum și pe baza unor date de electrofiziologie — creșterea platoului potențialului de acțiune în atriul de broască sub acțiunea *c*AMP, teofilinei, catecolaminelor, se poate admite că *c*AMP facilitează influxul de Ca^{2+} [90]. Au fost obținute și dovezi mai directe în acest sens, arătîndu-se că DB-*c*AMP ca și adrenalina, concomitent cu creșterea forței de contracție a inimii izolate de șobolan, cresc și captarea Ca^{45} [108, 109]. În celula renală *c*AMP și dibutiril derivatul cresc intens calciul schimbabil la nivelul mitocondriilor precum și efluxul cationului spre citoplasmă [21]. Ar rezulta deci că creșterea prin mijloace farmacodinamice a *c*AMP facilitează captarea intracelulară a Ca^{2+} la nivelul „pompei de calciu" sarcoplasmice, crescînd astfel disponibilitatea acestui cation pentru eliberarea ce precede contracția, realizînd astfel creșterea răspunsului contractil.

5.4. Contracția și relaxarea farmacologică a musculaturii netede

5.4.1. *Adenilat-ciclaza și receptorul adrenergic*

Agoniștii adrenergici și în special catecolaminele figurează printre cei mai eficienți factori stimulatori ai adenilat-ciclazei. Creșterea ratei de sinteză a *c*AMP sub acțiunea catecolaminelor a fost evidențiată în ficat, creier, mușchi striat, mușchi neted, miocard, țesut adipos, plămîn, splină, eritrocite de la diferite specii de animale. Blocarea efectelor de stimulare adrenergică a adenilat-ciclazei prin substanțe β-blocante constituie un argument farmacologic important pentru ipoteza că aceste efecte sînt mediate de β-adrenoreceptori. Există dovezi foarte concludente că cele mai multe efecte metabolice ale catecolaminelor sînt mediate de către *c*AMP. Potența relativă a unei serii de catecolamine în stimularea adenilat-ciclazei în miocardul de cîine a fost asemănătoare cu potența lor relativă ca agenți inotropici *in vivo* și aceste efecte au putut fi blocate cu un β-blocant. Suplimentar, efectele inotrope pot fi potențate cu

teofilină. Pe inimă izolată de şobolan s-a putut dovedi corelaţia directă dintre efectele inotrop pozitive ale adrenalinei şi concentraţia AMP ciclic (vezi fig. 2).

Pe baza datelor experimentale, Robinson, Butcher şi Sutherland [138] au emis ipoteza că adenilat-ciclaza în anumite ţesuturi poate fi echivalată cu β-adrenoreceptorul. Această ipoteză poate fi susţinută în măsura în care se ia în consideraţie interrelaţia α-receptorilor şi β-receptorilor adrenergici, variaţia răspunsului la stimulare α sau β de la specie la specie, sau de la ţesut la ţesut chiar, în funcţie de starea fiziologică etc. Există însă un număr de exemple cînd adenilat-ciclaza pare superpozabilă cu β-receptorul adrenergic. Autorii elaborează o serie de modele ale receptorilor adrenergici în corelaţie cu adenilat-ciclaza, încercînd să integreze datele experimentale, adesea contradictorii, obţinute de diverşi autori. În esenţă se consideră că receptorii α şi β-adrenergici pot fi în realitate diferiţi centri de interacţie ai adenilat-ciclazei cu diferiţi hormoni sau substanţe farmacodinamic active. Rolul *c*AMP ca mediator al stimulilor adrenergici este evident pentru efectele β ale catecolaminelor de stimulare a glicogenolizei musculare. Enzima regulatoare (protein-kinaza) *c*AMP stimulată controlează astfel metabolismul glicogenului, atît la nivelul căilor de sinteză, cît şi de degradare. Protein-kinaza activată de *c*AMP a fost evidenţiată în ţesutul gras, în inimă, în creer şi în alte ţesuturi. Prezenţa protein-kinazei activate prin *c*AMP în organele ce conţin receptori adrenergici sugerează că adrenalina şi noradrenalina îşi exercită efectele lor metabolice şi probabil cele fiziologice prin activarea acestor kinaze. Funcţia *c*AMP ca mediator al catecolaminelor la nivelul β-receptorilor în toate ţesuturile în care produc efecte metabolice este argumentată de următoarele fapte:

1. Ordinea de eficacitate (potenţa) catecolaminelor de creştere a concentraţiei de *c*AMP este similară cu cea în care aceste amine produc răspuns metabolic.
2. Agenţii blocanţi previn creşterea *c*AMP.
3. Substanţele care blochează fosfo-diesteraza mimează sau potenţează acţiunea catecolaminelor privind formarea *c*AMP şi a răspunsului metabolic în diferite ţesuturi.
4. Prostaglandinele şi insulina reduc efectul lipolitic al adrenalinei şi formării de *c*AMP în ţesutul adipos. Stimularea α-receptorilor duce la scăderea *c*AMP.

Efectele de activare a unei serii de catecolamine asupra adenilat-ciclazei miocardice și pulmonare de șobolan sînt superpozabile cu efectele farmacodinamice ale acestor substanțe la nivelul structurilor respective unde este presupusă activarea unui anumit subtip de β-receptori (tabelul III).

TABELUL III

Corelații între activarea beta-receptorilor adrenergici și activarea adenilat ciclazei

Substanța	*Țesutul*	*Receptor adrenergic*	*Efect*[a] *(Potență relativă)*	*Activare*[b] *Adenilat-ciclază (potența relativă)*
Izoprenalină	Inimă	β_1	1000 (Inotropism)	3,9
Adrenalină			48	0,6
Nor-adrenalină			34	1
Izoprenalină	Pulmon	β_2	1000 (Bronhodilatație)	33
Adrenalină			230	6,2
Nor-adrenalină			3	1

a) După [9]. b) După [27].

Activarea β_1-receptorilor cardiaci ca și a lipolizei se realizează în următoarea ordine de eficacitate descrescîndă: izoprenalină > noradrenalină > adrenalină, în timp ce activarea β_2-receptorilor (bronhodilatație, vasodilatație, glicogenoliză, hiperlactacidemie) se realizează în ordinea izoprenalină > adrenalină > noradrenalină. Rezultă că izoprenalina este un activator nespecific al celor două subtipuri de receptori adrenergici. Suplimentar, blocantele β-adrenergice au selectivitate distinctă pentru β_1 sau β_2-receptori adrenergici, concordantă cu capacitatea lor de blocare a activării adenilat-ciclazei cardiace sau din țesutul

adipos (exemplu practololul) şi respectiv de blocare a enzimei pulmonare (exemplu butoxamina). Aceste fapte alături de altele de acest tip demonstrează că adenilat-ciclaza din diferite ţesuturi are proprietăţi similare cu subtipul de β-receptori din ţesutul respectiv ceea ce pledează suficient de convingător pentru conceptul că enzima este parte integrantă a β-receptorului adrenergic.

5.4.1.1. Contracţia adrenergică a musculaturii netede

5.4.1.1.1. Contracţia uterină

Triner şi col. [176] realizează un studiu sistematic pe uter izolat de şobolan, pe arteră izolată de şobolan, iepure, cîine, precum şi pe arteră gastroepiploică izolată de om.

Uterul izolat de şobolan răspunde prin contracţie la prima expunere de adrenalină în timp ce la a doua administrare răspunsul contractil este absent. Oxitocina de asemenea nu induce nici o contracţie pe uterul prealabil expus la adrenalină. Autoinhibiţia prin adrenalină este complet prevenită prin propranolol, un β-adrenoblocant. Inhibiţia contracturii uterine prin adrenalină este posibil să fie mediată prin *c*AMP care este format cu o rată înaltă după stimularea adenilat-ciclazei prin catecolamine. La prima administrare de adrenalină contracţia se produce deoarece nu este contracarată de *c*AMP care nu s-a format încă într-o cantitate suficientă, în timp ce concentraţia subsecventă de adrenalină este ineficientă datorită acumulării de *c*AMP.

Într-adevăr adrenalina, noradrenalina şi izoproterenolul stimulează net activitatea adenilat-ciclazei, cu aproape 100 % peste valoarea de control.

Propranololul în concentraţie de 1μM nu modifică semnificativ activitatea adenilat-ciclazei însă antagonizează efectul stimulator al adrenalinei sau izoprenalinei. Curbele doză-răspuns ale acestora din urmă sînt deplasate paralel spre dreapta.

Administrarea de fentolamină 0,1mM tinde să accentueze efectul de stimulare a adenilat-ciclazei prin catecolamine. Efectul inhibitor al catecolaminelor asupra contractilităţii uterine faţă de oxitocină este reîntîlnit şi faţă de alţi stimuli. Astfel

adrenalina produce scăderea contracţiei uterine induse de acetilcolină. Blocarea contracţiei prin adrenalină este complet prevenită prin propranolol, aşa cum dealtfel inhibă şi stimularea adenilat-ciclazei prin catecolamine. Aceste fapte pledează pentru o relaţie cauzală între activitatea adenilat-ciclazei, tonusul şi contractilitatea uterină.

5.4.1.1.2. Contracţia muşchiului neted arterial

Determinările distribuţiei adenilat-ciclazei şi fosfo-diesterazei de-a lungul arborelui vascular la cîine au pus în evidenţă că cea mai înaltă activitate se găseşte în arterele coronare. Activitatea bazală a adenilat-ciclazei tinde în general să crească către periferia arborelui vascular. Aşa de exemplu în arterele coronare activitatea adenilat-ciclazei este de trei ori mai mare ca în partea superioară a aortei. *c*AMP, ATP şi enzimele care controlează nivelul nucleotidului ciclic sînt localizate la nivelul păturii musculare a peretelui arterial [182].

Fosfo-diesteraza are o activitate mai intensă în segmentele superioare ale aortei şi scade în segmentele inferioare de cîteva ori, în segmentul lombar şi mai intens în artera femorală [176]. Raportul fosfo-diesterază-adenilat-ciclază scade de 3—4 ori către periferia arborelui arterial indicînd că *c*AMP poate fi mai eficient inactivat în porţiunile superioară ale aortei decît în segmentele sale mai periferice datorită prezenţei unei cantităţi relativ mai mari de fosfo-diesterază. Rezultă că modificări mai marcate ale *c*AMP intracelular, cu consecinţe funcţionale corespunzătoare, sînt mai de aşteptat în vasele periferice decît în cele centrale, ca răspuns la un stimul hormonal sau farmacologic. Catecolaminele cresc formarea de *c*AMP în artera gastroepiploică umană în ordinea următoare: izoproterenol > > adrenalină > noradrenalină. Propranololul în concentraţie de 10 μM antagonizează efectul catecolaminelor asupra formării *c*AMP. Din contra, fentolamina tinde să crească cantitatea de *c*AMP. Cu toată acumularea de *c*AMP pe care o produc, catecolaminele contractă arterele izolate perfuzate sau fragmente de aortă izolată. Izoproterenolul relaxează arterele după ce au fost în prealabil contractate în diverse modalităţi. Propranololul previne efectul relaxant al izoprenalinei şi accentuează contracţia adrenalinică.

Izoproterenolul şi propranololul exercită efecte opuse asupra contracţiei adrenalinice, primul scăzînd-o, secundul crescînd contracţia. Aceasta este de aşteptat şi din efectele acestor substanţe asupra activităţii enzimei: izoproterenolul stimulează activitatea adenilat-ciclazei iar propranololul antagonizează activitatea de stimulare prin adrenalină. Creşterea activităţii adenilat-ciclazei implică creşterea *c*AMP şi consecutiv scăderea contractilităţii vaselor. Invers, scăderea adenilat-ciclazei-*c*AMP duce la creşterea contracţiei. Relaţia cauzală între creşterea *c*AMP şi scăderea contractilităţii vaselor este evidenţiată şi de scăderea răspunsului contractil la adrenalină dependentă de creşterea dozei de dibutiril *c*AMP [176].

5.4.1.2. Relaxarea adrenergică

Atît stimularea α- cît şi β-adrenergică produc relaxarea muşchiului neted intestinal. Relaxarea muşchiului intestinal prin stimularea β-adrenergică este corelată cu stimularea proceselor metabolice în timp ce mecanismul α-adrenergic implică o creştere a permeabilităţii membranei celulare. Andersson [6] în experimente pe colon de iepure stimulat α-adrenergic cu l-fenilefrină demonstrează că relaxarea, iniţial, nu este acompaniată de nici un efect metabolic. După o latenţă de 60—180 s însă, se înregistrează o scădere a *c*AMP, şi a fosforilazei *a*, precum şi o creştere a conţinutului de ATP. Relaxarea β-adrenergică prin l-izoproterenol este asociată cu creşterea *c*AMP, creşterea activităţii fosforilazei *a*, a glucozo-6-fosfatului şi lactatului şi scăderea ATP şi CrP (creatin fosfatului) în măsură egală cu efectele izoproterenolului. Reducerea de aproximativ 4 ori a conţinutului de calciu din intestin nu împiedică creşterea *c*AMP şi activarea fosforilazei *a* prin izoprenalină dar scăderea ATP este de mai mică amplitudine. Andersson consideră limitarea în timp a reducerii ATP prin izoproterenol şi dependenţa de calciu a acestui fenomen ca fiind corelate cu stimularea mecanismului de legare intracelulară a calciului. Într-adevăr, microzomii din muşchiul intestinal de iepure acumulează Ca^{45} în prezenţa a 0,35 mM ATP şi a Mg^{2+}, proces stimulat semnificativ prin izoproterenol şi prin *c*AMP. Blocanţii β-adre-

nergici ar bloca mecanismele de legare a calciului. Din datele experimentale rezultă:

— creşterea conţinutului de *c*AMP precede relaxarea prin izoproterenol.

— mărimea creşterii conţinutului de *c*AMP şi amplitudinea relaxării sînt direct corelate.

— blocanţii β-adrenergici inhibă atît creşterea *c*AMP cît şi relaxarea. *c*AMP are aceleaşi efecte relaxante şi metabolice ca şi stimularea β-receptorilor adrenergici.

— creşterea *c*AMP nu este Ca^{2+}-dependentă.

Se propune următoarea secvenţă: stimularea β-adrenergică activează adenilat-ciclaza şi creşte conţinutul de *c*AMP; este astfel activat mecanismul captării calciului şi muşchiul neted se relaxează. Depolarizarea duce la eliberarea calciului şi muşchiul se contractă. Concentraţia calciului liber din mioplasmă ocupă un loc central, reglînd nivelul tonusului muşchiului neted iar corelaţia cu *c*AMP se realizează printr-un mecanism de tip *feed-back* negativ. Creşterea *c*AMP stimulează procesul de acumulare şi concentraţia calciului este astfel redusă. Scăderea calciului duce la stimularea activităţii fosfo-diesterazei şi implicit la scăderea *c*AMP.

5.4.2. *Corelaţiile* c*AMP*, c*GMP — sistem colinergic*

Numeroase date experimentale subliniază antagonismul între *c*AMP şi *c*GMP în controlul diferitelor procese biologice [148]. Dintre acestea se evidenţiază contracţia muşchiului neted produsă de *c*GMP sau DB-*c*GMP şi relaxarea generată de DB-*c*AMP [132], stimularea colinergică sau prin *c*GMP a eliberării enzimelor lizozomale şi inhibiţia adrenergică sau prin *c*AMP [71, 72], acţiunea antilipolitică a insulinei şi acetilcolinei cu creşterea *c*GMP şi acţiunea inhibitorie a acestuia din urmă asupra lipolizei prin *c*AMP sau adrenalină [73] etc. Se consideră de asemenea că efectele inotrop pozitive cardiace ale catecolaminelor şi inotrop negative ale acetilcolinei sînt mediate prin creşterea *c*AMP şi respectiv *c*GMP. Se presupune de asemenea existenţa receptorului muscarinic colinergic, asociat cu guanilat-ciclaza [148], fapt pentru care pledează eficienţa atropinei în prevenirea creşterii prin acetilcolină a *c*GMP din inimă [52]. În general acetilcolina şi alţi agonişti colinergici nu au

efect semnificativ asupra *c*AMP, crescînd însă *c*GMP în inimă, muşchiul neted intestinal, în creier, în pulmon etc. Acetilcolina în concentraţie de 1μM creşte de peste trei ori concentraţia *c*GMP din pulmonul de şobolan, efect blocat de o concentraţie echivalentă de atropină şi nemodificat de concentraţii mai mari de hexametoniu [91, 92]. În mod similar în pulmonul de cobai a fost pusă în evidenţă creşterea *c*GMP în prezenţa acetilcolinei, fizostigminei şi neostigminei [161]. Acetilcolina nu produce însă creşterea activităţii guanilat-ciclazei, în experimentul respectiv, în timp ce fizostigmina creşte activitatea enzimei cu aproximativ 50% în prezenţa sau absenţa acetilcolinei. Absenţa efectului atropinei asupra activării guanilat-ciclazei prin fizostigmină şi absenţa activării enzimei prin acetilcolină [161] sugerează interacţia fizostigminei cu un receptor insensibil la acetilcolină. Guanilat-ciclaza este nemodificată, de asemenea de către neostigmină, edrofoniu, carbacol, metacolină, betanecol şi pilocarpină. Oxotremorina produce o creştere semnificativă a *c*GMP în cortexul cerebral şi în cerebel la şoarece în paralel cu dezvoltarea fenomenelor colinergice [48]. Pe baza acestor date se poate admite că *c*GMP este implicat în transmisia colinergică, servind eventual ca mesager secund pentru acetilcolină.

5.4.2.1. Contracţia colinergică a musculaturii netede

Acetilcolina scade formarea *c*AMP în ţesutul uterin de şobolan, efectul stimulator al adrenalinei fiind scăzut cu 30, 65 şi 70% de către acetilcolină în concentraţii de respectiv 1, 10 şi 100 μM. În aceste concentraţii nu modifică cantitatea de *c*AMP la martor. Efectul inhibitor al acetilcolinei asupra stimulării formării *c*AMP este antagonizat de atropină, ceea ce sugerează o anumită specificitate a acţiunii acetilcolinei. S-a arătat de asemenea că nici acetilcolina şi nici carbacolul nu alterează activitatea fosfo-diesterazei în acelaşi ţesut. Acetilcolina nu modifică activitatea bazală, nestimulată, a adenilat-ciclazei şi nici efectele de stimulare ale enzimei prin adrenalină sau NaF [177]. Diferenţele în relaxarea prin adrenalină a contracturii uterine produse prin acetilcolină şi oxitocină, în lumina mecanismelor biochimice ale efectelor de relaxare a musculaturii netede prin adrenalină, arată că compuşii adrenergici şi colinergici îşi

pot realiza unele din efectele lor prin intermediul unor căi biochimice comune, respectiv sistemul *c*AMP. Compușii colinergici scad *c*AMP și activează adenilat-ciclaza în inima de cîine. Efectul inhibitor al compușilor colinergici asupra glicogenolizei induse de adrenalină [20] poate fi de asemenea explicat prin interacția acetilcolinei și adrenalinei cu sistemul *c*AMP. Autorii consideră că acetilcolina ar putea acționa fie prin creșterea Ca^{2+} ionizat intracelular care apoi poate media efectul inhibitor [42, 152], deoarece Ca este cunoscut ca inhibitor al adenilat-ciclazei în diferite țesuturi [11, 102], fie prin modificarea fluxului de sodiu și potasiu transmembranar (cauzată de acetilcolină), ceea ce ar duce la creșterea activității ATP-azei-Na^+-K^+-dependente care poate deveni astfel un potențial competitor cu adenilat-ciclaza pentru același substrat; dacă ATP-aza-Na^+-K^+-dependentă are o afinitate mai mare pentru ATP decît adenilat-ciclaza, formarea AMP ciclic poate fi încetinită prin lipsa relativă de substrat. Deoarece acetilcolina nu are efect asupra ratei de formare a *c*AMP în condiții bazale iar efectul adrenalinei de accelerare a acestui proces este redus prin acetilcolină, pare mai probabilă ipoteza că adenilat-ciclaza și ATP-aza competiționează pentru același substrat.

Din datele prezentate de diverși autori [56, 57, 148] rezultă funcția *c*AMP în eliberarea acetilcolinei la sinapsele colinergice. Adrenalina și noradrenalina cresc *c*AMP și frecvența potențialelor miniaturale de placă terminală precum și numărul de cuante pe un impuls nervos. Aceste efecte au fost de asemenea observate la DB-*c*AMP precum și la inhibitori ai *c*AMP fosfodiesterazei de tipul teofilinei [126]. Contracția mușchiului neted intestinal este asociată cu creșterea activității fosforilazei *a*, creșterea glicogenolizei și scăderea ATP și CrP. Există astfel o similitudine surprinzătoare între efectele metabolice asociate contracției și cele din relaxarea produsă de stimularea β-adrenergică [6]. Creșterea tensiunii contractile în colonul de iepure prin carbaminoilcolină se însoțește de creșterea conținutului de *c*AMP și a activității fosforilazei *a* iar ATP și CrP scad după 60 secunde de la administrarea stimulatorului colinergic. Efectul carbaminoilcolinei a fost blocat prin atropină și nu prin sotalol. În preparatele sărăcite în calciu, carbaminoilcolina nu produce nici un efect. Efectul contracturant al K^+ a fost de asemenea însoțit de creșterea *c*AMP. Imidazolul de asemenea potențează contractura prin carbaminoilcolină și Ca^{2+} în prepa-

ratele sărăcite în calciu. Creşterea conţinutului de *c*AMP din muşchi poate fi produsă fie prin creşterea activităţii adenilat-ciclazei fie prin scăderea activităţii fosfo-diesterazei. Creşterea conţinutului de *c*AMP prin carbaminoilcolină şi K^+ spre deosebire de cea prin izoproterenol este Ca^{2+}-dependentă şi se realizează probabil prin mecanisme diferite. Într-adevăr agenţii contracturanţi menţionaţi mai sus scad semnificativ activitatea fosfo-diesterazei. Imidazolul pe de altă parte creşte activitatea enzimei. În preparatul sărăcit în calciu, carbaminoilcolina şi K^+ nu inhibă activitatea fosfo-diesterazei. Ar rezulta că modificarea activităţii fosfo-diesterazei este dependentă de concentraţia de calciu deşi unele substanţe farmacodinamic active îi modifică activitatea şi în absenţa cationului. Cheung [31, 32] observă că ionul de calciu ca şi Cu^{2+} şi Zn^{2+} inhibă activitatea fosfo-diesterazei din creier la concentraţii de $2 \cdot 10^{-3}$ M. Din determinările efectuate de Andersson [7, 8] pe homogenat de colon de iepure rezultă că concentraţiile de Ca^{2+} peste $1 \cdot 10^{-7}$ M inhibă semnificativ activitatea fosfo-diesterazei. Creşterea calciului intracelular prin acetilcolină şi alţi agonişti colinergici ar putea, prin intermediul creşterii concentraţiei calciului din citosol peste $1 \cdot 10^{-7}$ M, să genereze creşterea concentraţiei de *c*AMP, via inhibiţia fosfo-diesterazei. Creşterea concentraţiei *c*AMP, la rîndul său, creşte captarea activă a calciului, se activează fosfo-diesteraza şi muşchiul se relaxează.

O altă variantă poate fi: creşterea concentraţiei intracelulare de calciu inhibă adenilat-ciclaza [11, 102], *c*AMP scade şi implicit este promovată relaxarea.

5.4.3. *Relaxantele „musculotrope" ale musculaturii netede*

Metilxantinele. Teofilina este cunoscută ca inhibitor puternic al fosfo-diesterazei în diferite ţesuturi. Triner şi col. [176] găsesc pentru fosfo-diesteraza din artera de iepure $I_{50} = 1{,}4$ mM teofilină. Relaxarea produsă de teofilină este direct corelată cu inhibiţia fosfo-diesterazei, ceea ce permite autorilor concluzia că efectul relaxant al substanţei respective poate fi mediat de acţiunea sa asupra fosfo-diesterazei. Teofilina, ca dealtfel *c*AMP şi DB-*c*AMP, inhibă contracţia spontană sau indusă prin K

la nivelul teniei coli de cobai [126], probabil prin inhibiţia influxului de calciu sau prin prevenirea eliberării calciului intracelular care activează sistemul contractil.

La papaverină, cunoscută ca o substanţă relaxantă musculotropă, s-a evidenţiat de asemenea efectul său inhibitor de fosfo-diesterază în aorta de iepure (I_{50} = 80 μM), creier, uter şi diafragm de şobolan, precum şi în miocardul de pisică [176, 188]. La nivelul creierului de şobolan şi miocardului de pisică papaverina inhibă puternic fosfo-diesteraza, obţinîndu-se valori ale I_{50} de respectiv 6 şi 2 μM. Aceste concentraţii situează papaverina printre cele mai eficiente inhibitoare de fosfo-diesterază. Papaverina în domeniul de concentraţii care inhibă fosfo-diesteraza în aorta de iepure scade răspunsul contractil al organului respectiv la adrenalină. Există o corelaţie cantitativă între gradul de inhibiţie al fosfo-diesterazei şi efectul său relaxant, aşa cum s-a demonstrat şi pe artera femorală izolată de cîine (fig. 5.4). Implicit, există o corelaţie între gradul de relaxare şi creşterea nivelului AMP ciclic. Date comparabile cu cele descrise mai sus au fost obţinute atît cu papaverină cît şi cu teofilină pe muşchiul neted uterin. Papaverina [5—8] creşte semnificativ legarea Ca^{2+} de fracţiunea microzomală, fenomen concomitent cu scăderea ATP. În absenţa Ca^{2+} scăderea ATP nu se mai produce. Remarcabil este faptul că diferitele forme de fosfodiesterază se comportă diferit calitativ şi cantitativ faţă de papaverină şi nitroglicerină. Astfel papaverina şi nitroglicerina

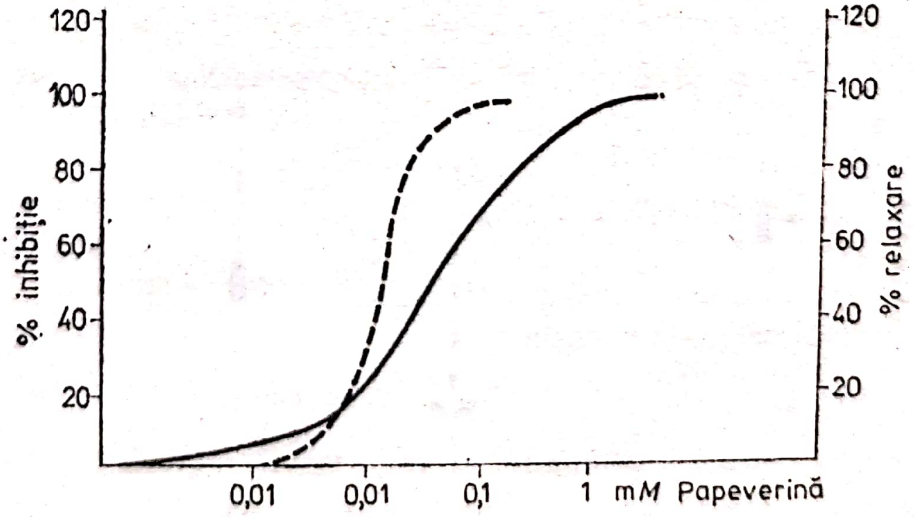


Fig. 5.4. Efectele relaxatoare (— —) ale papaverinei asupra arterei izolate şi efectele inhibitorii (—) asupra fosfo-diesterazei după [176].

inhibă activitatea fosfo-diesterazei legată de elementele structurale ca microzomi şi mitocondrii, stimulînd însă activitatea fosfo-diesterazei citoplasmatice. Acţiunea stimulantă a papaverinei asupra fosfo-diesterazei citoplasmatice poate explica de ce efectul său de stimulare a fosforilazei *a*, enzimă citoplasmică, a fost mai slab decît al izoprenalinei, deşi ambele substanţe cresc în aceeaşi măsură conţinutul total de *c*AMP. Nu toate substanţele antispastice însă îşi realizează efectul prin intermediul sistemului *c*AMP [74], ceea ce sugerează existenţa şi a altor mecanisme relaxatoare în afară de cele β-adrenergice şi de tip papaverinic.

5.5. AMP ciclic — substanţe farmacodinamic active lipolitice şi antilipolitice

5.5.1. *AMP ciclic şi lipoliza*

Partea majoritară a acizilor graşi liberi plasmatici sînt rezultatul lipolizei trigliceridelor din ţesutul adipos (fig. 5.5). Concentraţia acizilor graşi plasmatici liberi la un moment dat este rezultanta interacţiunii diverşilor factori cum sînt lipoliza, reesterificarea acizilor graşi, oxidarea lor etc. Scindarea legăturii acid gras-glicerol din poziţia alfa a acestuia din urmă se realizează prin intervenţia triglicerid-lipazei a cărei activitate este

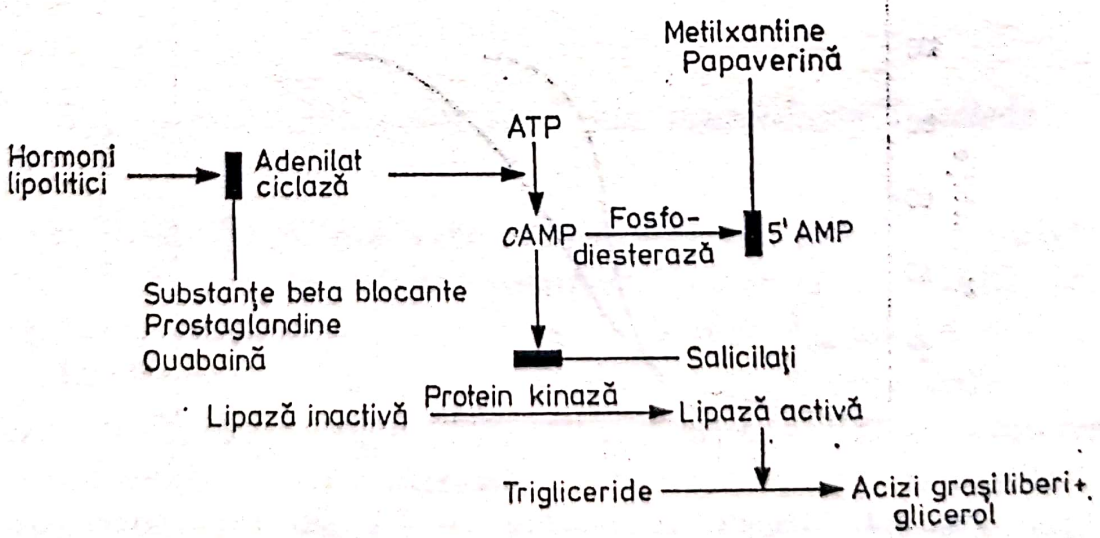


Fig. 5.5. Locul de acţiune al unor activatori şi inhibitori ai lipolizei

reglată sau modificată de numeroși hormoni și agenți farmacologici. Un rol esențial în reglarea triglicerid-lipazei revine *c*AMP. Prin intermediul protein-kinazei, *c*AMP convertește lipaza inactivă în forma sa activă, care la rîndul său scindează primul acid gras și foarte probabil pe al doilea din molecula trigliceridei. S-a demonstrat de asemenea că ATP este necesar pentru stimularea activității lipolitice prin *c*AMP în extractele de țesut gras, inhibitorii fosforilării oxidative de tipul 2,4-dinitrofenolului sau oligomicinei, antagonizînd stimularea lipolizei prin noradrenalină, cofeină sau dibutiril ciclic AMP. Alți inhibitori metabolici sau enzimatici nespecifici de tipul iodoacetatului și *N*-etilmaleinimidei sînt inhibitori ai lipolizei. Aceasta sugerează că ATP este necesar pentru stimularea lipolizei prin *c*AMP-dependent protein-kinază. Diferitele etape ale lipolizei hormonosensibile sînt diferit dependente de căile metabolice generatoare de energie în adipocite [46]. ATP generat prin glicoliză ar fi mai disponibil pentru activitatea adenilat-ciclazei, în timp ce fosforilarea triglicerid-lipazei este dependentă de fosforilarea oxidativă.

S-a sugerat existența a două compartimente intracelulare, diferite de *c*AMP [91] arătîndu-se că formarea acestuia în adipocitele izolate precede stimularea lipolizei prin noradrenalină sau ACTH în prezența teofilinei. Noradrenalina sau teofilina singure cresc lipoliza dar nu și concentrația de *c*AMP intracelular. Efectul sinergic al noradrenalinei și al inhibitorilor de fosfo-diesterază a fost mai mare în privința acumulării de *c*AMP decît în ce privește lipoliza. Din datele obținute, autorii consideră că numai o mică fracțiune de *c*AMP intracelular este implicată în activarea lipolizei. Efectul *c*AMP și dibutiril-*c*AMP asupra lipolizei în adipocite variază cu compoziția ionică a mediului. Stimularea lipolizei prin *c*AMP a fost demonstrată în mediu fosfat conținînd numai Na^+ sau numai K^+ deși acesta din urmă stimulează lipoliza numai cînd rata bazală a fost scăzută. Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^+ și oubaina influențează anumite etape inițiale ale lipolizei intracelulare sau la nivelul membranei celulare. Compușii care mobilizează lipidele includ catecolaminele, alte amine biologice și unii hormoni. Dintre acestea din urmă cităm: hormonul de creștere, ACTH, hormonul tireotrop, hormonul luteinizant, glucagonul, serotonina, vasopresina, glucocorticoizii și tiroxina. Hormonii care din contra inhibă mobilizarea lipidelor sînt insulina și prostaglandinele.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL IV

Controlul farmacologic al lipolizei

Activatori	*Mecanism implicat*	*Inhibitori*	*Mecanism implicat*
Adrenalină Noradrenalină Izoprenalină Glucagon ACTH Glucocorticoizi Hormon de creştere Hormoni tiroidieni	Activarea adenilat-ciclazei	Beta-blocante adrenergice	Blocajul adenilat-ciclazei
		Prostaglandine	Blocajul adenilat-ciclazei
		Ac. nicotinic	Blocajul adenilat-ciclazei
		Adenozină AMP ADP ATP AMP ciclic	Blocajul adenilat-ciclazei prin *feed back* negativ
Inhibitori MAO Tiramină Amfetamină Serotonină	Probabil activarea adenilat-ciclazei	Glicozide cardiotonice	Blocajul adenilat-ciclazei
		Salicilaţi Antidepresive triciclice Papaverină Dipiridamol	Blocajul protein-kinazei
		Dinitrofenol	Scăderea ATP (Decuplarea fosforilării oxidative).
Metilxantine Dibutiril-AMP ciclic şi alţi derivaţi	Blocajul fosfo-diesterazei Activarea pro-tein-kinazei	Iodacetat Fluorură	Scăderea ATP (Blocarea glicolizei)
		Amital Rotenon Antimicină	Scăderea ATP (Blocajul metabolismului oxidativ mitocondrial)
		Oligomicină	Scăderea ATP

5.5.1.1. *Catecolaminele, AMP ciclic și lipoliza*

Catecolaminele activează lipoliza prin intermediul activării adenilat-ciclazei și/sau prin activarea β_1-receptorilor adrenergici. Activarea β-receptorilor prin catecolamine, în măsura în care aceștia pot fi considerați o structură aparte de adenilat-ciclază, duce la activarea, indirectă, a acesteia din urmă. Acest efect de activare este specific blocat prin antagoniștii β-adrenergici. Efectele catecolaminelor asupra mobilizării acizilor grași sînt primar mediate prin receptorii β-adrenergici. Analiza farmacologică a acestor efecte, a corelațiilor lor cu structura catecolaminelor studiate, precum și a modalității diferite de blocare farmacologică au permis lui A. Arnold și colab. [9] să distingă două subtipuri de receptori β, din care tipul β_1 este prezent și în celulele grase, iar β_2 în alte țesuturi (vezi capitolul „Sistem adrenergic"). În acest context noradrenalina (NA) este egală sau mai intens stimulatoare decît adrenalina (A) a β_1-receptorilor iar izoproterenolul este de 5 ori mai activ decît NA în stimularea acestora. Antagoniștii β-adrenegici de tipul propranololului blochează acțiunea catecolaminelor la nivelul ambelor subtipuri de β-receptori în timp ce practololul antagonizează preferențial efectele β_1-adrenergice. În general se poate afirma că β-blocantele blochează preferențial efectele lipolitice ale catecolaminelor. Activarea lipolizei prin catecolamine implică creșterea *c*AMP, creșterea paralelă a adenilat-ciclazei, proteinkinazei, triglicerid-lipazei cu eliberarea acizilor grași și glicerolului. Foarte asemănător crește glicogen-fosforilaza. Stimularea prin catecolamine a adenilat-ciclazei se diferențiază de alte modalități de activare prin faptul că este blocată prin β-adrenoblocante. Consecințele acțiunii catecolaminelor asupra țesutului gras sînt complexe, în afară de lipoliză, crește implicit procesul de reesterificare a acizilor grași liberi cu creșterea consumului de *c*AMP, creșterea lipogenezei din glucoză, glicogenoliză, glicoliză, creșterea consumului de oxigen etc. În general se admite că, deși există un mare număr de hormoni sau agenți activatori ai adenilat-ciclazei, există o specificitate considerabilă în acțiunea acestor agenți. La om și alte specii catecolaminele apar ca singurii agenți activatori ai adenilat-ciclazei, semnificativi fiziologic, în activarea lipolizei.

Scanned with OKEN Scanner

5.5.1.2. Substanţe lipolitice prin creşterea AMP ciclic

Nu există o corelaţie directă între cantitatea de *c*AMP acumulată şi intensitatea lipolizei. Datele prezentate de diverşi autori pledează în majoritate pentru acest punct de vedere. Nucleotizii ciclici de tipul dibutiril ciclic AMP stimulează lipoliza în timp ce *c*AMP nu manifestă acest efect. GMP ciclic creşte de asemenea lipoliza. Explicaţia eficacităţii mai mari a dibutiril-*c*AMP faţă de *c*AMP este dată de faptul că acesta din urmă penetrează mai greu în celulă. Altă modalitate de a creşte cantitatea de *c*AMP este realizată prin intermediul inhibitorilor de fosfo-diesterază. Cafeina creşte lipoliza în ţesutul adipos şi potenţează marcat acumularea *c*AMP prin catecolamine. În adipocite sînt două tipuri de fosfo-diesteraze — una cu greutate moleculară mare, care hidrolizează *c*AMP şi *c*GMP, cu o constantă Michaelis pentru *c*AMP de 20—400 μM, şi una cu greutate moleculară mai mică, cu o constantă Michaelis de 2—5 μM şi cu activitate mai redusă faţă- de *c*GMP. Testarea activităţii lipolitice a 64 inhibitori de fosfo-diesterază [12] derivaţi de xantină substituită în poziţiile 1, 3, 7 sau 8 a dovedit că cei mai activi sînt compuşii conţinînd grupări nepolare în poziţiile 1 şi 3, evidenţiindu-se o strînsă corelaţie între potenţa lipolitică şi inhibiţia fosfo-diesterazei. Remarcabil e faptul că papaverina deşi este un puternic inhibitor de fosfo-diesterază inhibă totuşi lipoliza. Papaverina inhibă însă captarea de oxigen şi sinteza de ATP în mitocondriile hepatice, dovedindu-se un inhibitor al metabolismului oxidativ ceea ce ar putea să reducă şi activarea dependentă energetic a triglicerid-lipazelor, de unde rezultă efectul său inhibitor asupra lipolizei. Dipiridamolul, substanţă vasodilatatoare ca şi papaverina, precum şi imipramina, substanţă antidepresivă, blochează lipoliza, efectele lor fiind aproximativ identice cu cele ale papaverinei. S-a sugerat că atît papaverina cît şi dipiridamolul şi imipramina blochează activarea protein-kinazei.

5.5.1.3. Substanţe antilipolitice prin scăderea AMP ciclic

S-a arătat că imidazolul [28] în concentraţii mari activează fosfo-diesteraza. De asemenea în concentraţii de 5—50 mM blochează acţiunea lipolitică a noradrenalinei, ACTH şi teofilinei dar nu a dibutiril *c*AMP. Rezultă că imidazolul scade

lipoliza mai probabil prin inhibiția adenilat-ciclazei decît prin activarea fosfo-diesterazei. Acidul nicotinic inhibă acțiunea lipolitică a catecolaminelor ca și a ACTH, teofilinei etc., printr-un mecanism antagonic de tip competitiv. Cel mai probabil mecanism prin care acidul nicotinic inhibă lipoliza și acumularea de *c*AMP este inhibiția nespecifică a adenilat-ciclazei. Piridiltetrazolul, un analog al acidului nicotinic, este un puternic inhibitor al lipolizei *in vitro* și *in vivo*, capabil să scadă trigliceridele plasmatice și colesterolul la om.

Prostaglandinele antagonizează o bună parte din acțiunile catecolaminelor, inclusiv lipoliza indusă de acestea. Această acțiune inhibitorie a fost evidențiată și față de lipoliza prin ACTH, glucagon, teofilină și hormonul de creștere sau glucocorticoizii. Prostaglandina E_1 ca și insulina sau acidul nicotinic nu inhibă acțiunea lipolitică a dibutiril *c*AMP la șobolan. Eliberarea prostaglandinelor din țesutul gras de șobolan poate fi crescută prin stimulare hormonală cît și nervoasă. Această eliberare a prostaglandinelor este suficientă pentru a inhiba mobilizarea acizilor grași liberi, ceea ce sugerează că acestea reglează activitatea lipolitică a hormonilor prin intermediul unui *feed-back* negativ. Astfel stimularea nervoasă produce creșterea formării și eliberării prostaglandinelor care inhibă eliberarea suplimentară a noradrenalinei din terminațiile nervoase simpatice, acționînd astfel ca un sistem de control *feed-back* negativ asupra neurotransmisiei sinaptice. Diferiți hormoni care cresc concentrația *c*AMP intracelular cresc și eliberarea și concentrația prostaglandinelor în țesuturi (Tabelul V). Totuși nu există încă o dovadă convingătoare că *c*AMP, per se, modulează biosinteza, metabolismul și acțiunile prostaglandinelor. Multe studii recente însă evidențiază o strînsă corelație, frecvent întîlnită, între prostaglandine și formarea *c*AMP. Astfel PGE_1 stimulează activitatea adenilat-ciclazei și crește *c*AMP în inimă, pulmon, oase, leucocite, eritrocite, trombocite, epifiză, corp galben, suprarenale etc. Pe de altă parte, PGE_1 inhibă activitatea adenilat-ciclazei în tubii colectori renali, măduvă, stomac, țesut adipos și cerebel. S-a postulat chiar că prostaglandinele mediază procesele de activare hormonală și de formare a *c*AMP. În acest context prostaglandinele ar fi mesagerul secund iar *c*AMP al treilea mesager al acțiunii hormonale [116, 117]. Salicilații, inhibitori ai sintezei prostaglandinelor, ar trebui, la prima vedere, să acționeze în sens lipolitic. În

TABELUL V

Efecte ale prostaglandinei E_1 mediate prin AMP ciclic

Efecte stimulatorii			*Efecte inhibitorii*		
Ţesutul	*Specia*	*Efectul*	*Ţesutul*	*Specia*	*Efectul*
Inimă	Cobai	Inotrop şi cronotrop pozitiv	Tubi renali	Iepure	Inhibiţia transportului apei
Pulmon	Şobolan	Bronhodilataţie	Vezică urinară	Broască	Inhibiţia transportului apei
Aortă	Şobolan	Vasodilataţie	Stomac	Cîine	Inhibiţia secreţiei gastrice
Rinichi	Cîine, şobolan	Inhibiţia reabsorbţiei apei şi natriului	Ţesut adipos	Şobolan, om	Inhibiţia lipolizei
Os Leucocite	Şobolan Om	Rezorbţie osoasă Migrarea şi stabilizarea membranei lizozomale	Cerebel	Pisică	Inhibiţia descărcării potenţialului de acţiune
Eritrocite	Om	Fragilitate, eritropoeză			
Trombocite	Şobolan, om	Inhibarea agregării			
Hipofiză anterioară	Şobolan	Stimularea secreţiei ACTH, STH, LH			
Corp galben	Bovine	Secreţie de progesteron			
Tiroidă	Cîine, şobolan	Secreţie tiroxină			
Cortico-supra-renală	Şobolan	Secreţie corticosteron			

Scanned with OKEN Scanner

realitate, salicilații inhibă eficient lipoliza declanșată de catecolamine, ACTH, glucagon, teofilină, hormon de creștere, glucocorticoizi, sugerînd că acești compuși blochează proteinkinaza *c*AMP-dependentă printr-un mecanism competitiv cu nucleotidul ciclic, la nivelul centrului regulator al enzimei [38].

5.5.1.4. Alte substanțe antilipolitice prin scăderea AMP ciclic

Nucleozidele și nucleotidele. Administrarea de ATP, AMP, *c*AMP, în mediul de incubație al țesutului adipos inhibă eliberarea de acizi grași liberi prin adrenalină. Hipoxantina, xantina, purina și adenozina (5—50 μM) sînt puternici inhibitori ai lipolizei prin adrenalină dar nu și ai lipolizei prin ACTH. Inozina și adenozina în concentrație de 1mM inhibă acțiunea lipolitică a dibutiril-*c*AMP. De asemenea creșterea eliberării glicerolului prin glucagon este marcat inhibată de adenozină, AMP, ADP, ATP, *c*AMP, coenzima-A, NAD, NADP, NADH și NADPH. Adenozina are concentrația I_{50} de 50 μM, asupra fenomenului descris mai sus.

Fluorura și iodoacetatul inhibitori ai glicolizei sînt și inhibitori ai lipolizei prin interferență cu necesitățile de energie pentru activarea atît a adenilat-ciclazei cît și pentru lipoliza prin *c*AMP. Fluorura (10mM) este cel mai puternic activator cunoscut al adenilat-ciclazei în omogenate celulare, în timp ce în celulele intacte blochează aproape complet acumularea de *c*AMP indusă de catecolamine și metilxantine. Efectul inhibitor nespecific al fluorurii asupra lipolizei în celulele grase intacte poate fi rezultatul depleției de ATP.

Glicozizii cardiotonici, ouabaina, digitoxina, strofantina *k* stimulează oxidarea glucozei și inhibă lipoliza activată prin catecolamine. S-a sugerat că ouabaina acționează prin inhibarea adenilat-ciclazei, deși acest efect ar fi indirect, și anume prin scăderea potasiului intracelular. Concentrații relativ mari de digitoxină inhibă nespecific lipoliza produsă de toți agenții lipolitici cunoscuți. Nu este stabilit cu certitudine dacă efectele glicozizilor cardiotonici asupra lipolizei sînt consecința inhibiției captării potasiului ca urmare a blocării ATP-azei-Na^+ — — K^+-dependente. Dealtfel nu este clar încă în ce măsură acest ultim efect — de inhibare a ATP-azei-Na^+ — K^+-dependente este corelat cu efectul inotropic al glicozizilor cardiotonici.

5.6. Acţiuni farmacodinamice ale *c*AMP şi derivaţilor

Date fiind implicaţiile funcţionale multiple ale sistemului *c*AMP este foarte promiţătoare perspectiva utilizării derivaţilor ca agenţi farmacoterapeutici. Cercetările iniţiale au testat capacitatea *c*AMP exogen de a mima efectele specifice ale diferiţilor hormoni. Rezultatele însă nu au fost dintre cele mai încurajatoare. Se admite în general că nucleotizii şi în special *c*AMP [137] nu penetrează în celule, ceea ce pe de o parte împiedică compusul respectiv să ajungă la locul de acţiune iar, pe de altă parte, îl expune la acţiunea fosfo-diesterazei. Faptul că *c*AMP exogen produce unele efecte farmacodinamice — în concentraţii cu 3—4 ordine de mărime superioare celor fiziologice intracelulare — permite să se admită totuşi o slabă penetraţie transmembranară a nucleotidului. Dintre efectele reproduse prin administrarea *c*AMP cităm relaxarea musculaturii netede, efectul inotrop pozitiv, lipoliza, facilitarea transmisiei neuromusculare etc. Efectele farmacologice ale *c*AMP sînt net potenţate de către inhibitorii de fosfo-diesterază de tipul metilxantinelor sau papaverinei. Au fost descrise corelaţii farmacologice, ca de exemplu — antagonismul de lungă durată a analgeziei morfinice prin *c*AMP administrat intravenos sau intracerebral la şoareci şi şobolani [65]. De remarcat că teofilina antagonizează de asemenea analgezia prin morfină. Pretratamentul cu pargilină (inhibitor de monoamin-oxidază) previne antagonismul *c*AMP- morfină. Aceste date au fost confirmate de alţi autori [55] cu menţiunea că şi alţi compuşi de tipul ATP, AMP, adenină şi adenozină antagonizează analgezia morfinică. Aceste fapte corelate cu slaba penetrabilitate a barierei hemato-encefalice, de către *c*AMP injectat intravenos, sugerează că mai de grabă un produs de degradare al nucleotidului, de tipul adenozinei ar putea fi implicat în antagonismul descris, prin penetrarea secundară în sistemul nervos central şi creşterea consecutivă a sintezei locale de *c*AMP.

Analogii *c*AMP (fig. 5.6) obţinuţi sînt caracterizaţi de faptul că sînt mai rezistenţi la hidroliza prin fosfo-diesterază şi eventual sînt mai liposolubili, ceea ce le favorizează penetraţia în celule. Au fost sintetizaţi derivaţi prin acilare în poziţia N^6 şi/sau $O^{2'}$ în vederea creşterii liposolubilităţii, sau derivaţi prin substituirea ribozei cu arabinoza sau xiloza, analogi amidici, derivaţi prin înlocuirea O esteric cu sulf (fosforotioaţi ciclici), esterii

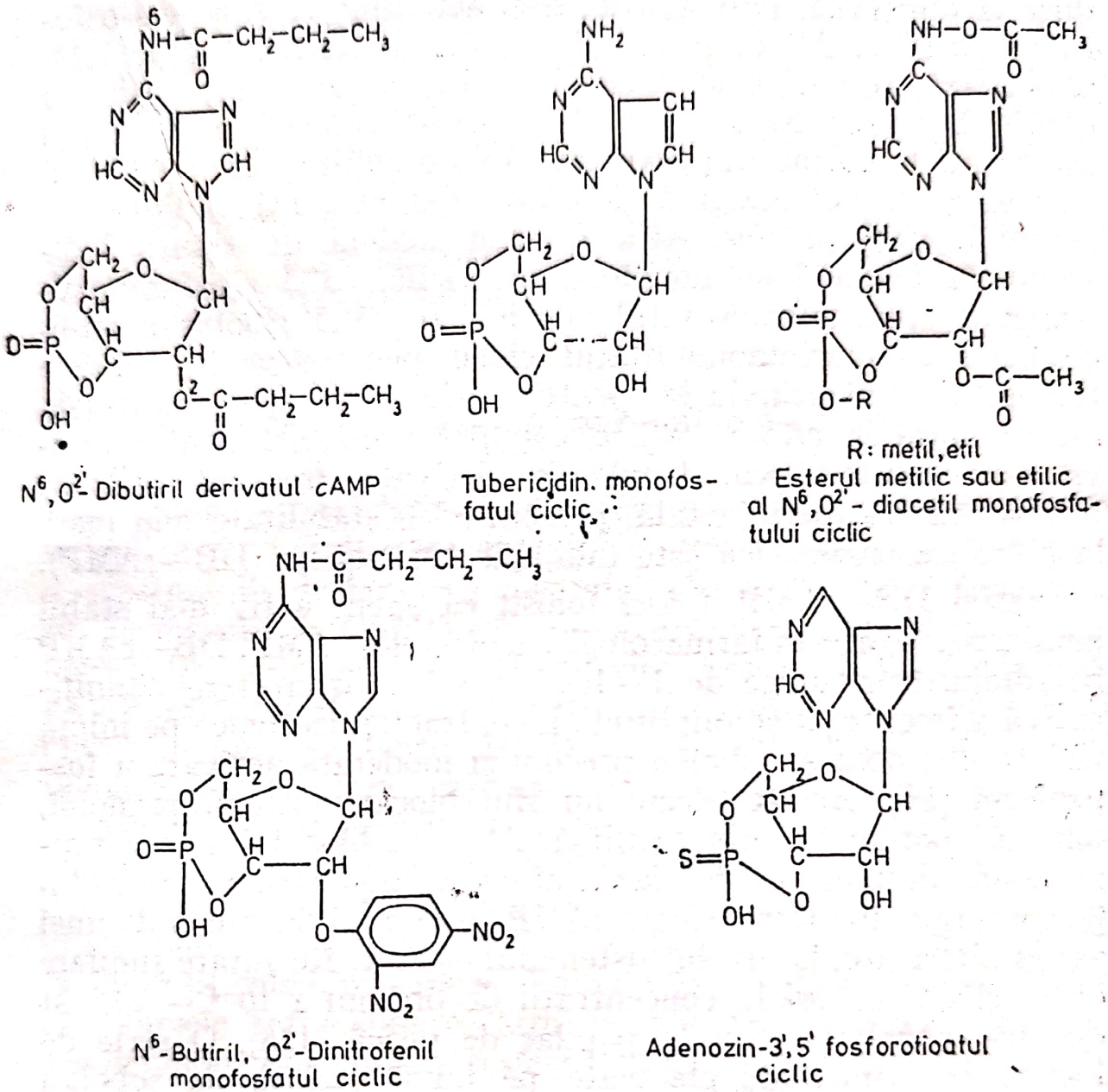


Fig. 5.6. Derivați ai adenozinmonofosfatului ciclic

metilici ai *c*AMP etc. Studiul acțiunii diverșilor derivați asupra protein-kinazei *c*AMP-dependente a evidențiat corelația activării enzimatice cu prezența OH neblocat în poziția 2′ a ribozei [111]. Într-adevăr, acilarea crește stabilitatea și eficacitatea *c*AMP fără să-i crească semnificativ transportul transmembranar [63; 142]. Substituirea cu un radical acil în poziția N^6 sau $O^{2'}$ sau în ambele poziții permite obținerea unor derivați rezistenți la hidroliză prin fosfo-diesterază. Dintre compușii de acest tip, respectiv N^6-monoacetil, monobutiril, monohexanoil, monooctanoil, și monolauril, cel mai eficient activator al fosforilazei s-a dovedit monobutiril derivatul [63]. Substituția în poziția $O^{2'}$

duce la obţinerea unui derivat slab activator al glicogen-fosforilazei *in vitro*. Alt derivat, tubericidinmonofosfatul ciclic [41] stimulează mai eficient fosforilaz-β-kinaza în comparaţie cu *c*AMP. Derivaţii N^6,$O^{2'}$-diacetil-3',5'-AMP, esterii metil şi etil sintetizaţi în scopul obţinerii unei liposolubilităţi crescute [114] s-au dovedit mai toxici decît *c*AMP dar eficienţi inhibitori ai ascitei *Ehrlich in vivo*. Alţi compuşi analogi de tipul: 3',5'-arabinofuranoziladeninmonofosfatul ciclic, 3',5'-ribofuranozil-6-mercaptopurinmonofosfatul ciclic şi 3',5'-ribofuranozil-6-metilmercaptopurinmonofosfatul ciclic penetrează în celulele tumorale, evidenţiindu-se pentru primul compus conversia intracelulară la *c*AMP [96], o condiţie probabilă pentru activitatea carcinostatică. Unul din derivaţii frecvent utilizaţi în cercetarea experimentală, prezentînd o stabilitate mai mare la hidroliza enzimatică este dibutiril AMP ciclic (DB—*c*AMP).

Astfel DB—*c*AMP a fost folosit ca agent activ mai stabil pentru reproducerea farmacologică a efectelor *c*AMP. DB—*c*AMP în administrări unice de 1—10 μM produce o creştere semnificativă a frecvenţei şi amplitudinii contracţiei izotonice pe inimă izolată de cobai şi şobolan precum şi moderată activare a fosforilazei [89]. Aceste efecte nu sînt blocate prin propranolol, dar sînt potenţate prin teofilină. Absenţa blocajului prin propranolol desigur evidenţiază absenţa implicării receptorului β-adrenergic în acest efect, *c*AMP acţionînd la nivelul unei verigi ulterioare, la nivelul sistemului efector. Rezultate similare obţin şi alţi autori la concentraţii de ordinul a 10^{-4} — 10^{-3} M de DB—*c*AMP pe muşchi papilar de pisică [158]. O serie de lucrări experimentale efectuate pe inimă izolată de şobolan nu au putut pune în evidenţă efectul inotrop pozitiv al DB—*c*AMP, fiind notate chiar efecte inotrop negative [2, 16, 137]. Meinertz şi col. [108, 109] efectuînd însă experimente standardizate pe preparate izolate de miocard de la diferite specii de mamifere evidenţiază efecte pozitive în toate preparatele utilizate, subliniind că efectele de acest tip nu sînt dependente de specie sau de preparatul utilizat. O corelaţie interesantă stabilesc Cohn şi col. [33] din care rezultă funcţia *c*AMP în reglarea narcozei. Autorii evidenţiază că DB—*c*AMP antagonizează potenţarea prin noradrenalină a narcozei induse de amobarbital la şobolan. Alte efecte generate de doze mari de noradrenalină, inclusiv cele toxice, nu sînt antagonizate de DB—*c*AMP. Lipsa analogiei dintre efectele induse de noradre-

nalină şi DB—*c*AMP administrate intracerebral contestă conceptul că efectele noradrenalinei sînt mediate în creier numai de către sistemul *c*AMP. Perfuzia glandelor suprarenale la pisică [76], cu *c*AMP sau DB—*c*AMP (0,2—4mM) nu evidenţiază o creştere semnificativă a eliberării de catecolamine şi nu potenţează efectele unor concentraţii submaximale de acetilcolină sau calciu, ceea ce sugerează că *c*AMP spre deosebire de calciu nu mediază direct procesul secretor respectiv.

5.7. AMP ciclic şi cuplajul stimul—efect farmacodinamic

Din datele experimentale privind nivelele la care calciul îndeplineşte funcţii de cuplaj rezultă importanţa esenţială a acestuia în declanşarea efectului, fie prin stimul fiziologic, fie farmacologic (cuplaj stimul-eliberare, cuplaj stimul-efect-contracţie, secreţie etc.). În diferite sisteme biologice în care *c*AMP este implicat funcţional s-a dovedit necesar şi calciul [135]; în aproape toate sistemele creşterea *c*AMP este acompaniată de creşterea captării Ca^{2+} sau necesitatea de calciu în mediu extern pentru ca răspunsul să fie observat. Această afirmaţie nu pare să fie adevărată însă pentru toate sistemele cunoscute. Aşa de exemplu glucagonul şi adrenalina stimulează glicogenoliza şi gluconeogeneza în ficat prin creşterea *c*AMP, în absenţa calciului extern. Nu este exclus să intervină calciul din sursele intracelulare; fapt pentru care pledează blocajul fenomenului biochimic (creşterea *c*AMP) prin tetracaină. Adrenalina stimulează atît producţia de *c*AMP cît şi mobilizarea calciului din inimă. Ambii mesageri sînt necesari pentru realizarea creşterii scindării glicogenului. În absenţa Ca^{2+} adrenalina produce încă creşterea *c*AMP şi activarea fosforilaz-*b*-kinazei dar nu şi creşterea fosforilazei *a* şi a scindării glicogenului. În transmisia neuro-musculară operează un sistem de control similar. Eliberarea acetilcolinei din veziculele sinaptice este posibilă în prezenţa calciului extern (cuplajul stimul-eliberare) şi este inhibată de concentraţii mari de Mg^{2+}. Stimularea electrică pe fragmente de creier duce la creşterea conţinutului de *c*AMP, cafeina şi teofilina crescînd eliberarea transmiţătorului prin stimuli electrici. Ionul de calciu nu este capabil singur să provoace eliberarea neurotransmiţătorului. Miledi şi Slater [110] încercînd, să demonstreze rolul direct al calciului

în acest proces prin microinjecţii de calciu în terminaţiile presinaptice nu au reuşit să producă eliberarea de acetilcolină. Ar rezulta că ionul de calciu ori nu este factor de cuplare stimul-eliberare, ori realizează această funcţie împreună cu un alt factor. Acest aspect a fost relevat de Yoshida şi col. [184], pe vezicule izolate de glande salivare demonstrînd necesitatea de ATP, un factor proteic şi calciu pentru creşterea eliberării de amilază, precum şi de Selinger şi Naim [151] care arată necesitatea de calciu pentru creşterea secreţiei de amilază atît prin adrenalină cît şi prin *c*AMP. Metilxantinele alterează legarea calciului şi fluxul în membranele subcelulare şi inhibă fosfo-diesteraza. Acest ultim efect s-ar putea datora similitudinii structurale cu *c*AMP. Prin analogie s-ar putea presupune că *c*AMP produce mobilizarea calciului din rezervoarele intracelulare. S-a demonstrat [44] că *c*AMP stimulează captarea şi rata *turnover*-ului Ca^{2+} în reticulul sarcoplasmic izolat din inima de cîine.

Anumiţi hormoni stimulează captarea intracelulară a calciului fără activarea adenilat-ciclazei, ceea ce face mai posibil ca, uzual, interacţia unui hormon cu o suprafaţă celulară anumită să ducă la creşterea simultană a permeabilităţii la calciu şi activarea adenilat-ciclazei. Creşterea subsecventă a *c*AMP intracelular acţionează ca un „*feed forward*" activator în interiorul celulei, prevenind captarea calciului în rezervele intracelulare sau prin mobilizarea calciului de la nivelul acestora.

Se naşte întrebarea, în ce măsură *c*AMP şi Ca^{2+} pot servi ca mesageri universali, precum şi care-i maniera inducerii unui răspuns specific al celulei efectoare. Apriori se impune, în sens biologic, un singur răspuns: celula, unitate individualizată morfofuncţional răspunde la diverşi stimuli în raport cu resursele sale funcţionale şi particularităţile acestor resurse.

Stimulul declanşează o cale biochimică comună care acţionează în acelaşi timp ca sistem de control al mărimii secvenţelor următoare. Rasmunssen [135] propune şi sistematizează un model interesant de control precum şi modul de a opera în sens specific. Primul ordin de specificitate se realizează la nivelul suprafeţei celulare. De exemplu glucagonul stimulează activitatea adenilat-ciclazei, provocînd gluconeogeneză hepatică dar nu gluconeogeneză renală. Invers, hormonul paratiroid acţionează la nivel renal dar nu la nivel hepatic. Al doilea ordin de specificitate este determinat de caracterul univoc structural

și biochimic specific tipului de celulă. Este cazul diferenței de răspuns al ficatului față de mușchi la adrenalină. Acest hormon activează glicogenoliza în ambele țesuturi dar glucozo-6-fosfatul în mușchi este degradat la acid lactic în timp ce în ficat glucozo-6-fosfataza pune în libertate glucoza.

Al treilea ordin de specificitate constă în corelația de timp, de loc și în caracterul de specificitate al răspunsului celular, respectiv: o celulă particulară secretă un anumit produs ca răspuns la stimulare, acest produs este eliberat într-un anumit loc (în canalul de excreție, în fanta sinaptică sau în curentul sanguin), iar produsul eliberat de celula în speță are o anumită specificitate.

BIBLIOGRAFIE

1. M. Abe, L. M. Sherwood, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **48**, 2 (1972).
2. K. Ahren, A. Hjalmarson, O. Isaksson, *Acta Physiol. Scand.*, **82**, 79 (1971).
3. D. O. Allen, J. F. Clark, J. Ashmore, *J. Pharmacol. Exper. Therap.*, **185**, 379 (1973).
4. M. S. Amer, *Science*, **179**, 4075 (1973).
5. R. Andersson, N. P. Bergh, N. Svedmyr, *Scand. J. Resp. Dis.*, **53**, 125 (1972).
6. R. Andersson, L. Lundholm, E. Mohme-Lundholm, K. Nilsson, "Advances in cyclic nucleotide research", vol. 1, Raven Press, New York, 1972.
7. R. Andersson, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **32**, 321 (1973).
8. R. Andersson, *Acta Physiol. Scand.*, **87**, 3 (1973).
9. A. Arnold, J. P. Mc. Auliff, F. P. Luduena, T. G. Brown-Jr., A. M. Lands, *Fed. Proc.*, **25**, 590 (1966).
10. S. Bannai, J. R. Sheppard, *Nature*, **250**, 62 (1974).
11. H. P. Bär, O. Hechter, *Fed. Proc.*, **28**, 2, 571 (1969).
12. J. A. Beavo, N. L. Rogers, O. B. Crofford, J. G. Hardman, E. W. Sutherland, E. V. Newman, *Molec. Pharmacol.*, **6**, 597 (1970).
13. B. Beer, M. Chasin, D. E. Clody, J. R. Vogel, Z. P. Horovitz, *Science*, **176**, 4033, 428 (1972).
14. N. H. Bell, S. Queener, *Nature*, **248**, 343 (1969).
15. S. Berndt, U. Schwabe, *Brain Res.*, **63**, 303 (1973).
16. A. Bertelli, C. Bianchi, L. Beani, *Eur. J. Pharmacol.*, **19**, 130 (1972).
17. P. Bieck, K. Stock, E. Westermann, *Life Sci.*, **5**, 2157 (1966).

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 6

MECANISME BIOCHIMICE IMPLICATE ÎN ACȚIUNEA COMPUȘILOR NEUROPSIHOTROPICI

Folosirea medicamentelor cu acțiune asupra sistemului nervos central (SNC) pe scară tot mai largă include și o mare varietate calitativă a acestor substanțe. În același timp, publicațiile despre procesele metabolice din creier în stare normală și patologică, cît și despre acțiunea unor astfel de medicamente cresc în progresie geometrică. Cu toate acestea, cercetările întreprinse pe căi multiple, cu un bogat și variat arsenal tehnic nu au adus cunoștințele obținute la nivelul efortului depus.

Desigur s-au deschis căi noi în ultimii ani în acest domeniu, cum sînt succesele uneori spectaculoase obținute cu L-DOPA în tratamentul parkinsonismului sau cu clorpromazină în unele stări depresive. Ca și în alte domenii în care s-a acumulat un enorm material descriptiv este foarte greu de a separa modificările biochimice primare de cele secundare sau de a nu izola anumite căi metabolice de legăturile cu alte procese.

În consecință, ținînd seama de particularitățile biochimice observate în SNC, în stare normală sau patologică, de marea varietate a medicamentelor ce acționează la acest nivel, în interesul clarității textului ne vom limita la analiza modificărilor metabolismului catecolaminelor și altor amine din SNC. Dealtfel, astăzi este unanim admis că aceste amine acționează ca transmițători sau modulatori ai impulsurilor la capetele terminale ale neuronilor care-i sintetizează.

Noțiunea de mediator chimic a fost introdusă în 1905 de Elliot, după care în fibrele nervoase se eliberează în timpul funcționalității substanțe cu activitate biologică considerabilă. Problema transmisiei chimice a stimulilor nervoși a fost discutată încă din secolul III î.e.n. de Erastrostate, apoi de Galien, Paracelsius etc. Criteriile necesare unei substanțe chimice pentru

a avea un rol de mediator au fost mult discutate [132] și astăzi sînt admise adrenalina, noradrenalina, acetilcolina, serotonina, cît și mediatori sensoriali ca histamina și acidul gama-aminobutiric (GABA).

6.1. Metabolismul catecolaminelor

Țesutul cerebral la vertebrate conține trei catecolamine: adrenalina (A) sau epinefrina, noradrenalina (NA) sau norepinefrina și dopamina (DA). După datele existente, A din creier este înlocuibilă cu NA, care dealtfel și predomină, atît ca funcție, cît și ca rol [128]. Încă nu se știe dacă neuronii ce conțin NA sînt predominant funcționali stimulatori sau inhibitori. Se pare totuși că în condiții fiziologice NA exercită un rol inhibitor la locul eliberării [107].

Nu se cunoaște încă topografia detaliată a catecolaminelor în SNC. Noradrenalina predomină în hipotalamus (aproximativ 2 μg/g), A fiind în concentrație de 10% din cea a NA. DA predomină în corpii striați. Localizarea catecolaminelor variază mult cu vîrsta, diferite stări de stress, ritmul circadian etc. [24, p. 148-154]. Concentrația catecolaminelor suferă mari variații în diferite boli neuropsihice, cît și în urma tratamentului cu diferite medicamente. În consecință, distribuția catecolaminelor este esențial dinamică, fluctuantă.

6.1.1. *Biosinteza catecolaminelor*

Capacitatea de sinteză a catecolaminelor este o caracteristică a structurilor adrenergice, împărțite în general în două subdiviziuni. Prima este formată din celulele cromafine localizate în special în medulosuprarenală. A doua subdiviziune cuprinde neuronii adrenergici sau dopaminergici, care la mamifere se întîlnesc în fibrele simpatice postganglionare și în SNC. Atît linia de demarcație dintre aceste două subdiviziuni nu este clar delimitată, cît și localizarea biosintezei nu este precisă. În acest sens de un mare ajutor a fost folosirea microscopiei electronice și a histochimiei pentru topografia enzimelor implicate în biosinteza catecolaminelor [25].

Schema biosintezei catecolaminelor este prezentată în fig. 6.1, nde pentru claritate au fost trecute și catabolismul acestor amine.

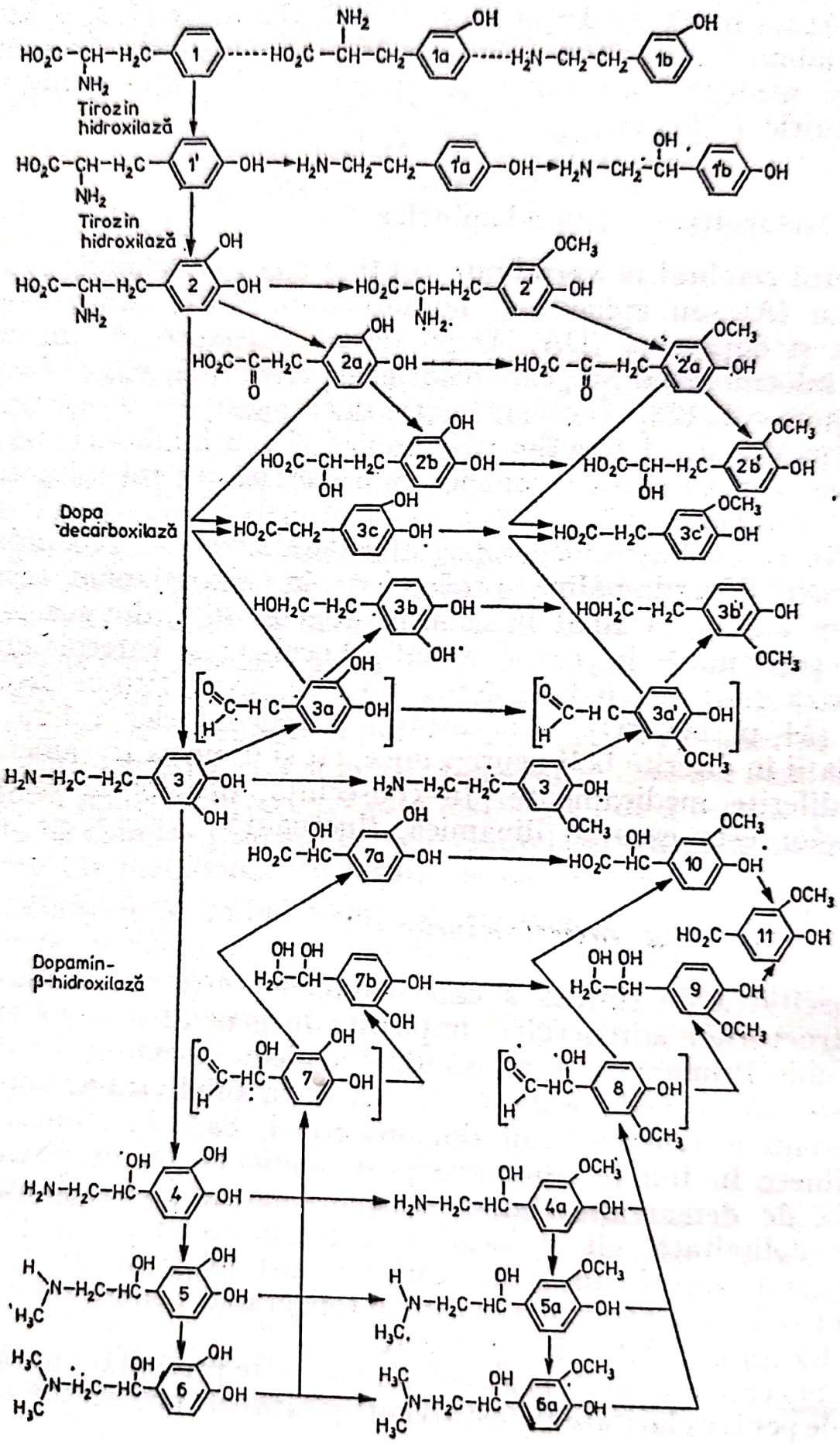


Fig. 6.1. Biosinteza şi degradarea catecolaminelor

Biosinteza şi degradarea catecolaminelor

Index Denumirea	*Index Denumirea*
1. Fenilalanină	4. Noradrenalină (NA)
1a. *meta*-Tirozină	4a. Normetanefrină
1b. *meta*-Tiramină	5. Adrenalină (A)
1'. *para*-Tirozină	5a. Metanefrină
1'a. *para*-Tiramină	6. *N*-metiladrenalină
1'b. Octopamină	6a. *N*-metilmetanefrină
2. 3,4-Dihidroxifenilalanină (DOPA)	7. 3,4-Dihidroxifenilglicoaldehidă
2'. 3-Metoxitirozină	7a. Acid 3,4-Dihidroximandelic
2a. Acid 3,4-Dihidroxifenilpiruvic	7b. 3,4-Dihidroxifenilglicol
2a'. Acid 3-metoxi-4-hidroxifenilpiruvic	8. 3-Metoxi-4-hidroxifenil-glicoaldehidă
2b. Acid 3,4-dihidroxifenillactic	9. 3-Metoxi-4-hidroxifenilglicol
2b'. Acid 3-Metoxi-4-hidroxifenillactic	10. Acid 3-Metoxi-4-hidroximandelic (VMA)
3. Dopamină (DA)	11. Acid vanilinic
3'. 3-Metoxitiramină	COMT-Catecol *o*-metil-transferază
3a. 3,4-Dihidroxifenilacetaldehidă	MAO-Monoamin-oxidază
3a'. 3-Metoxi-4-dihidroxifenilacetaldehidă	
3b. 3,4-Dihidroxifeniletanol	
3b'. 3-Metoxi-4-hidroxifeniletanol	
3c. Acid protocatechic	
3c'. Acid homovanilic (HMA)	

Tirozin-hidroxilaza este prima enzimă implicată în biosinteza catecolaminelor, catalizînd atît trecerea fenilalaninei în tirozină, cît şi a acesteia în 3,4-dihidroxifenilalanină (DOPA *2*). Această enzimă este deosebit de importantă, deoarece reacţiile catalizate de ea sînt mai lente şi deci devin limitante pentru întregul lanţ biosintetic [90]. În plus, fiind inhibată la anumite concentraţii de fenilalanină, DOPA şi NA, constituie un mecanism de control metabolic de tip *feed back* pentru biosinteză.

DOPA-decarboxilaza catalizează a doua etapă a biosintezei, de formare a dopaminei (DA) şi este prezentă în toate celulele structurilor adrenergice, dar şi în cantitate mare în ficat şi rinichi [25]. Această enzimă are o mică specificitate de substrat, deoarece pe lîngă DOPA, mai poate acţiona asupra *o*- şi *m*-tirozinei şi 5-hidroxitriptofanului. DOPA-decarboxilaza acţionează asupra aminoacizilor aromatici, influenţînd astfel metabolismul şi altor substanţe, cum ar fi serotonina. Depozitarea în structurile adrenergice a unor cataboliţi ca α-metil-dopamină, α-metil-NA şi metaraminol se datoreşte activităţii acestei enzime.

Dopamin-β-hidroxilaza este o cuprenzimă ce necesită acizii ascorbic şi fumaric pentru activitate [77]. Aceasta este singura enzimă din lanţul biosintetic localizată în formaţiunile de depozitare. Aproape 80% din enzimă se găseşte sub formă insolubilă în membrane, constituind o fracţiune cu numele de „cromomembrină A" [72]. După lucrări recente în acest domeniu, există un paralelism strîns între eliberarea enzimei şi cea a catecolaminelor în condiţii de stimulare [80, 84].

În cursul biosintezei catecolaminelor mai apar şi compuşi aparent cu o importanţă minoră, cum ar fi *m*-tirozină (*1a*), *m*- şi *p*-tiramină (*1b*, *1'a*)i α-metilnoradrenalină, octopamină (*1'b*). S-ar părea că tiramna şi octopamina pot trece în NA în SNC şi microzomii hepatici [4].

Activitatea adrenergică creşte sinteza NA în nervii terminali, observabilă prin creşterea excreţiei urinare a NA şi cataboliţilor, fără a modifica concentraţia lor din depozite. Se pare că scăderea nivelului NA din anumite regiuni stimulează sinteza catecolaminelor, aflată sub control metabolic de tip *feed back*. În acest sens este semnificativă inhibarea tirozin-hidroxilazei (reacţie limitantă) de tirozină la o concentraţie mai mare de $2 \cdot 10^{-5}$ M [74]. O schemă ipotetică a reglării biosintezei catecolaminelor, cît şi a principalelor medicamente ce acţionează la diferite nivele este prezentată în fig. 6.2.

6.1.2. *Catabolismul catecolaminelor*

Degradarea catecolaminelor are o importanţă şi mai mare pentru acţiunea unor medicamente, cu atît mai mult cu cît Euler [44] a arătat că doar o mică fracţiune din catecolaminele administrate sînt excretate nemodificate. În urma numeroaselor lucrări a devenit evident că metabolizarea catecolaminelor poate avea loc pe mai multe căi, predominînd dezaminarea şi *o*-metilarea (fig. 6.1, partea dreaptă). Dealtfel, perturbarea degradării catecolaminelor cu producerea unor cataboliţi toxici constituie unul din argumentele implicării acestor compuşi în boli neuropsihice.

Dezaminarea prin monoamin-oxidază (MAO) a fost observată încă de acum 45 ani, aceasta producîndu-se în toate ţesuturile. Apariţia inhibitorilor MAO de tip iproniazid (1-izonicotinil-2-izopropilhidrazină sau marsilid) a adus un nou avînt cercetărilor în acest domeniu. Inhibiţia prin MAO nu micşorează

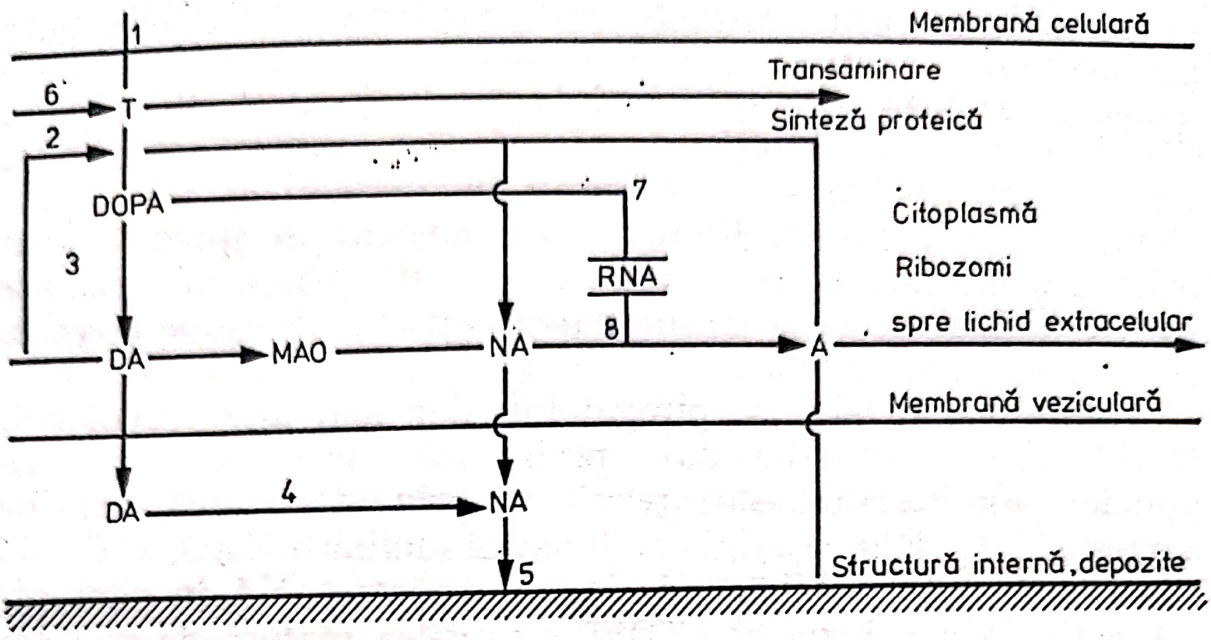


Fig. 6.2. Schema sintezei catecolaminelor și nivelul reglării ei, după [24];

	Substanțe inhibitoare
1 -aport de tirozină, controlat de permeează	Fenilalanină
2-hidroxilarea tirozinei	α-metiltirozină
3-decarboxilarea DOPA	α-metil-DOPA, derivați ai hidrazinei, hidroxilamină, α-MMT
4-hidroxilarea dopaminei (DA)	Feniletilamină, antabuse, 4-metiltropolonă, *m*-hidroxibenziloxiamină
5-incorporarea NA și A în depozite	Rezerpină
6-aport de cofactori, ex. piridoxal pentru decarboxilarea DOPA	
7-Sinteză ribozomială de tirozin-hidroxilază	Puromicină și
8- sinteză ribozomială de *N*-metil-transferază	Corticosteroizi

rația dispariției catecolaminelor circulante administrate și nici nu influențează excreția lor urinară [55]. MAO nu este responsabilă de terminarea acțiunii catecolaminelor eliberate în timpul stimulării simpatice sau administrate parenteral. În plus s-au semnalat mari diferențe în acțiunea inhibitorilor de MAO în funcție de specie, predominînd însă acumularea NA în creier și alte organe. Dezaminarea NA prin MAO duce la formarea aldehidei 3,4-dihidroximandelice (fig. 6.1.—7), oxidîndu-se mai departe în acidul respectiv, sau reducîndu-se la 3,4-dihidroxifenilglicol și eliminați împreună în proporții variabile. Iproniazidul este un inhibitor specific MAO, efectul fiind datorat părții alchilhidrazinice din moleculă [137], dar lista inhibitorilor nespecifici este destul de mare, cuprinzînd și agenți stimulanți sau chiar halucinogeni ca harmina, nialamida, cocaina, amfetamine. Acțiunea acestor inhibitori de MAO la schizofrenici este foarte slabă.

o-metilarea prin catecol-*o*-metiltransferază (COMT) pare să predomine cantitativ, prin demonstrarea că acidul vanilmandelic (VMA) este principalul metabolit al A şi NA [5]. COMT catalizează reacţia de transfer a grupării metil din *S*-adenozilmetionină unor varietăţi de catecoli şi este foarte răspîndită în ţesuturi. Produşii reacţiei sînt în special metanefrina şi normetanefrina (fig. 1, 4*a*, 5*a*), relativ inactivi, aşa încît *o*-metilarea, ca şi dezaminarea sînt căi eficace de metabolizare a catecolaminelor.

Inhibitorii COMT ca pirogalolul, dar mai ales tropolonele (2-hidroxiciclohepatrienona) prelungesc acţiunea catecolaminelor administrate sau rezultate prin stimularea nervilor simpatici [18]. Prin studiul combinat al inhibării MAO, al COMT şi cu cocaină (ce inhibă mai ales incorporarea NA în neuroni), s-a ajuns la concluzia că COMT este calea majoră de metabolizare, iar prin MAO se păstrează un mecanism suplimentar de degradare [71]. Cu tot materialul extrem de abundent în acest domeniu, s-ar părea că inactivarea fizică a catecolaminelor, prin reincorporarea în neuroni sau prin incorporarea în centrii extraneuronali, joacă un rol mai mare decît degradarea pe cale enzimatică. În consecinţă, inhibarea MAO şi COMT nu potenţează răspunsul cardiovascular în urma catecolaminelor administrate [25, 82].

În determinarea rolurilor COMT şi MAO în metabolizarea catecolaminelor, trebuie să se facă deosebirea între aminele administrate şi cele endogene, de diferenţele între ţesuturi şi specii. Calea inactivării catecolaminelor depinde de natura lor, de locul eliberării şi al incorporării. Cînd catecolaminele ajung în circulaţie, ele par să fie distruse prin MAO sau COMT, în ficat şi în rinichi, sau după Reston [109] prin depozitare în hematii, unde s-ar combina cu glutationul redus, dînd disulfuri mixte.

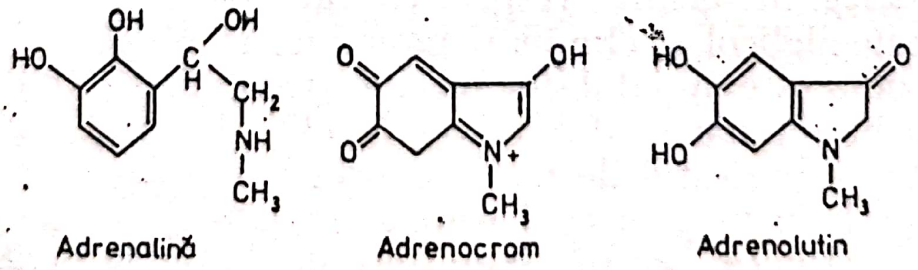


Fig. 6.3. Produşii de oxidare ai adrenalinei

Apariția unor cataboliți anormali, rezultați dintr-o metabolizare defectuoasă a catecolaminelor, este încă o problemă nerezolvată, datorită marilor variații individuale, de tehnică, condiții experimentale etc. În special adrenocromul a fost subiectul unor numeroase discuții, sumarizate de Hoffer [67]. Acest compus posedă o serie de proprietăți aparte (inhibă ATP-aza, colin-esteraza, glicoliza, mitoza etc.), oferind o ipoteză biochimică seducătoare, dar lipsesc probe directe, cum ar fi evidența lui analitică [98] (fig. 6.3).

6.1.3. *Depozitarea și incorporarea catecolaminelor*

Catecolaminele administrate dispar rapid din sînge (5—10 minute), iar în urină majoritatea lor se elimină în primele 3 ore [63, 98]. Faptul că peste 80% din radioactivitatea catecolaminelor marcate administrate se elimină în 24 ore indică un ritm rapid de inactivare. Deoarece analizele biochimice nu au permis obținerea unei concluzii clare, se admite difuziunea lor prin celule. În cazul SNC, inactivarea fizică prin incorporarea în neuronii prejuncționali sau celulele extraneuronale reprezintă calea majoră de inactivare. Cînd incorporarea are loc în neuroni, depozitarea în granule previne degradarea prin MAO, pe cînd blocarea depozitării prin rezerpină permite metabolizarea prin dezaminare.

Încă de mult timp [45] s-a demonstrat că NA se acumulează la capetele nervilor, fiind legată de particule subcelulare într-o formă neatacabilă de oxidanți, datorită implicării grupării hidroxil din catenă. Din aceste granule, NA poate fi eliberată rapid, de unde difuzează sau poate fi metabolizată. Această mare capacitate de difuzie, de depozitare, de eliberare și de reincorporare pare să fie trăsătura dominantă a catecolaminelor.

Astfel, acest dinamism explică nereproductibilitatea determinărilor biochimice și produce o notă de scepticism asupra interpretării acțiunii unor medicamente. SNC are o mare capacitate de incorporare pentru catecolamine, dar și pentru unii metaboliți. Tiramina, metaraminolul pot fi incorporați, competiționînd cu NA și acționînd deci ca falși neurotransmițători.

Studiile cantitative prin infuzia unui organ au indicat existența unei capacități limitate de incorporare [46]. Factorii limitanți nu se cunosc și pot fi legați de pătrunderea prin mem-

brană (în special asociat cu transportul sodiului), sau chimic, prin combinări labile de tipul disulfurilor mixte cu glutation, desfăcute apoi prin oxidarea acestuia [104]. Incorporarea este un proces necesitînd energie, asociat deci cu lanţul transportor de electroni ce furnizează ATP, iar acţiunea blocantă a rezerpinei pare să se manifeste la acest nivel [92].

Desigur, în cursul acestei dinamici a catecolaminelor are loc şi o metabolizare enzimatică, însă de o intensitate variabilă şi datorită multiplelor posibilităţi de reacţie susceptibilă la variaţii calitative. Astfel medicamentele care produc eliberarea catecolaminelor intraneuronal permit inactivarea prin MAO, producînd depleţia depozitelor fără un răspuns simpaticomimetic. Din contra, medicamentele ce produc eliberarea catecolaminelor extraneuronală produc un răspuns simpaticomimetic indirect şi *O*-metilarea reprezintă o cale majoră de inactivare.

Medicamentele ce acţionează asupra incorporării catecolaminelor sînt:

a) amine simpatomimetice ca metaraminol, dopamina, α-metil-NA, amfetamine. Unii analogi ai DOPA, ca α-metil-DOPA, α-MMT, scad concentraţia catecolaminelor din creier, dar pe cînd nivelul serotoninei şi DA revin la normal în 24 ore, NA rămîne scăzută mult timp datorită formării metaraminolului şi a α-metil-NA. Folosirea aminelor mai sus citate a permis obţinerea unor informaţii asupra incorporării. Astfel afinitatea ţesuturilor pentru incorporarea aminelor creşte prin prezenţa grupării OH în poziţia para, metilării în α şi scade prin *O*-metilare sau β-hidroxilare [15, 31, 69];

b) agenţi blocanţi adrenegici ca fenoxibenzamina;

c) blocanţi neuronali ca bretilium, guanetidină;

d) agenţi psichotropici. Rezerpina are o acţiune complexă, predominînd inhibarea incorporării catecolaminelor, în special a serotoninei în granule. În timp ce amfetaminele cresc nivelul normetanefrinei în creier, rezerpina creşte nivelul derivaţilor *O*-metilaţi. Imipramina, desmetilimipramina par să acţioneze mai mult asupra serotoninei, nemodificînd concentraţia NA din creier. Tot în această grupă intră cocaina, LSD, aminotriptilina ce inhibă incorporarea în particule de nervi izolaţi la concentraţii mari;

e) blocanți ai grupării sulfhidril ca iodoacetatul, mercuribenzoatul acționează la concentrații mari, probabil la nivelul transportului de membrană [79];

f) Inhibitori ai MAO (iproniazid) acționează complex. Astfel s-a observat scăderea *turnover*-ului NA endogene din creier probabil datorită creșterii concentrației catecolaminelor care inhibă prin *feed back* hidroxilarea tirozinei [103]. Totuși creșterea serotoninei depășește pe cea a catecolaminelor. Pretratarea animalelor cu inhibitori de MAO potențează efectul administrării DOPA.

g) decuplanți ai fosforilării oxidative ca dinitrofenolul sau blocanți ai lanțului transportor de electroni ca rotenona, antimicina A, clorpromazina.

Menționarea acestor substanțe ce acționează printre altele și la acest nivel indică complexitatea incorporării, cu atît mai mult cu cît nu există înrudiri structurale. Tiramina ocupă o poziție aparte printre aceste medicamente din cauza posibilităților de apariție în cantități semnificative în cursul biosintezei catecolaminelor (fig. 6.1, *1b*, *1'a*). Administrarea de tiramină produce o depleție parțială de NA din depozite și un răspuns simpaticomimetic. NA eliberată intră în circulație în proporție mai mare de 50% și din aceasta doar 30% a fost inactivată prin *O*-metilare, acest efect fiind diametral opus acțiunii rezerpinei. Guanetidina și α-metil-DOPA au o acțiune intermediară între rezerpină și tiramină. Observarea unui exces de tiramină în urina pacienților cu boli mintale [26], cît și administrarea acestui compus la voluntari au permis doar descoperirea unei forme de migrenă rezultată dintr-un deficit al conjugării tiraminei [117].

Această diferențiere în răspuns între tiramină și rezerpină pare să indice existența a două feluri de fixare a NA în depozite [31]. În depozitul sensibil la tiramină, NA ar fi metabolizabilă prin *O*-metilare, pe cînd în cel sensibil la rezerpină (probabil mai puternic legat) ar predomina dezaminarea prin MAO. Cert este că rezerpina activează activitatea MAO [75]. S-ar părea că există două mecanisme de concentrare a aminelor în neuronii adrenergici. Unul ar fi prin membrană și este blocat de ubaină, cocaină, bretilium și imipramină. Al doilea mecanism ar fi intraneural, manifestîndu-se în vezicule și este blocat de rezerpină, tetrabebenazină. Din păcate rezerpina eliberează pe lîngă NA și seotonină, și alte substanțe active ca histamina, bradikinina și scade concentrația GABA din creier etc.

Scanned with OKEN Scanner

Pe de altă parte, ATP joacă un rol sigur în fixarea NA, metabolismul ATP pare să fie paralel cu depleția aminelor din depozite, probabil prin implicarea AMP ciclic și a adenil-ciclazei. O moleculă de ATP poate lega patru molecule de catecolamine, care au cîte o sarcină pozitivă pe moleculă. Rezerpina blochează această fixare, permițînd acțiunea metabolizantă enzimatică. Dealtfel incorporarea NA este stimulată de ATP, ADP, AMP ciclic sau nucleotizi trifosfarilați ai citozinei, uridinei, inozinei [92].

6.1.4. *Dopamina și acțiunea DOPA*

Dopamina (Fig. 6.1—3) este prezentă în concentrații relativ mici în țesuturile periferice, majoritatea DA nu ajunge în circulație fiind rapid convertită în NA sub acțiunea dopamin-β-hidroxilazei în prezența ATP, Mg și NAD^+ sau $NADP^+$. Enzima se găsește și în sînge, scăzînd mult în cazuri de disautonomie familiară [7]. Distrugerea depozitelor din capetele terminale ale nervilor cu 6-hidroxidopamină micșorează mult activitatea enzimei din sînge [100]. Pe lîngă un rol intermediar în biosinteza NA, dopamina acționează ca un neurotransmițător central independent datorită existenței unor receptori separați de cei ai NA blocați selectiv de clorpromazină și haloperidol [129]. Dexamfetamina și apomorfina par să stimuleze sistemul dopaminergic. O anumită cantitate de DA este prezentă în toți neuronii adrenergici ca precursori ai aminelor hidroxilate. Neuronii dopaminergici se găsesc mai ales pe calea nigrostritiată ai căror axoni au un diametru foarte mic. După Baumgarten [12], DA ar fi primul neurotransmițător filogenetic, fiind înlocuită ulterior de aminele α-hidroxilate.

Deși multe medicamente cu acțiune centrală afectează metabolismul DA din corpii striați, majoritatea lor n-au specificitate, afectînd și alte amine. Astfel se deosebesc medicamente ce acționează direct asupra DA sau metaboliților, a biosintezei DA sau asupra eliberării ei din depozite. În tabelul I sînt prezentate cîteva medicamente împreună cu mecanismul lor predominant de acțiune. Prin studiul acțiunii acestor medicamente a devenit evident că dopamina este critică pentru activitatea locomotoare și comportarea motoare stereotipă de origine extrapiramidală [70]. După tabelul prezentat, reiese că dintre medicamentele dopaminergice ce produc activitate

TABELUL II

A.

Medicamente ce modifică activitatea dopaminergică în corpii striați

Medicament	*Mecanism de acțiune predominant*	*Bibliografie*
L-DOPA	crește DA, după decarboxilare	[71]
Apomorfină	stimulează direct receptorii DA	[43]
Amfetamine și amantidine	cresc eliberarea DA din depozite	[94]
Benzotropină, Anticolinergice	deplasează balanța acetilcolină-DA	[71]
Antihistaminice	în favoarea creșterii DA în sinapse	[24]

B.

Efecte motoare extrapiramidale

Efect	*Medicament*	*Intensitate (după [71])*
Hiperactivitate locomotoare	Apomorfină	slab, dar potențează DA
Comportare motoare stereotipă	Anticolinergice,	slab, dar potențează DOPA
Anticataleptic	DOPA, amfetamine, apomorfină	slabe
Antiparkinsonism	L-DOPA	foarte eficace
	Anticolinergice	slabe, dar potențează DOPA
	Antihistaminice	slabe, dar potențează DOPA

hiperlocomotoare, DOPA este cel mai eficace, iar apomorfina are acțiunea cea mai slabă. Fenotiazinele și butirofenonele ce inhibă receptorii DA vor inhiba hiperactivitatea locomotoare produsă de DA, DOPA, amfetamine. La tabelul II A ar mai trebui adăugați compuși cu acțiune multiplă, care scad DA striatală, cum ar fi rezerpina (prin depleție), metiltirozina (inhibarea sintezei), fenotiazinele, butirofenonele și bulbocapnină (blochează receptorii DA, crescînd *turnover*-ul). Faptul că modificarea activității dopaminergice este un mecanism comun unor medicamente cu structură diferită ce produc aceleași

TABELUL III

Date neurochimice în parkinsonism (după Horniykiewicz [71])

Regiune creier	*Control*	*Parkinsonism*
Nuclei caudați		
Dopamină (DA)	2,64	0,36
Acid vanilinmandelic (VMA) (*10*, fig. 6.1)	3,23	0,76
5-Hidroxitriptamină (ST)	0,33	0,12
DOPA-decarboxilază (DD)	641	55
Glutamat-decarboxilază (GAD)	58	22
Putamen		
DA	3,44	0,19
VMA	4,29	0,80
ST	0,32	0,14
DD	864	38
Globus pallidus		
DA	0,30	0,14
VMA	2,13	0,72
ST	0,23	0,13
Substantia nigra		
DA	0,46	0,07
VMA	2,32	0,41
ST	0,55	0,26
Capsula internă		
VMA, partea anterioară	1,67	0,42
VMA, partea posterioară	0,67	0,18

DA, VMA şi ST sînt exprimate în Mg substanță/gram țesut umed. L-DOPA-decarboxilaza este exprimată în număr impulsuri/minut/mg proteină. Glutamat-decarboxilaza este exprimată în μl CO_2/g țesut umed/oră

efecte clinice (scăderea DA produce catalepsie, hipokinezie, parkinsonism), cît și activitatea hiperkinezică a medicamentelor dopaminergice suportă ipoteza după care DA striatală este esențială pentru comportarea motoare de origine extrapiramidală [71].

Sindromul Parkinson este caracterizat printr-o perturbare a ganglionilor bazali, manifestată printr-o akinezie, rigiditatea mușchilor striați și tremor. Etiologia este complexă, necunoscută, iar formele clinice sînt destul de variate. Neurochimia

s-a afirmat tocmai prin determinările foarte delicate în diferite regiuni ale creierului, iar reușita tratamentului bolii Parkinson cu DOPA a impus cercetarea biochimică în boli neuropsihice. Pasul decisiv a fost făcut de Carlson [32] care a întocmit o hartă a răspîndirii dopaminei în creierul mai multor specii. Conținutul ridicat în DA din nucleii caudați și *putamen* se datorește existenței unei căi neuronale începînd din *substantia nigra* și sfîrșind în *globus pallidus*. De asemenea s-a găsit că distribuția acidului homovanilmandelic (VMA), cît și a enzimelor sintetizante tirozin-hidroxilază și DOPA-decarboxilază este paralelă cu cea a dopaminei [20]. Un alt argument în favoarea implicării DA în controlul funcției motoare din creier a fost producerea experimentală de perturbări motoare (catalepsie) de către rezerpină, neutralizată prin administrarea DOPA. Studii detaliate [70] au arătat că deficitul de dopamină din regiunea striatală caracteristic sindromului Parkinson se mai întîlnește în cazul otrăvirii cu săruri de mangan ce produce distrugeri de neuroni în *substantia nigra* și în urma unor medicamente neuroleptice ca butirofenona, fenotiazinele, bulbocapnina.

Astfel s-au strîns un număr suficient de date în favoarea unei relații directe între deficitul în dopamină striatală și simptomatologia sindromului Parkinson. Ca urmare, au și apărut încercări clinice de tratament folosind L-DOPA (3,4-dihidroxifenilalanină, *2*, fig. 6.1) precursor intermediar al DA, care în contrast cu aceasta, poate străbate bariera sînge-creier [23]. Efecte spectaculoase au fost observate încă de la început, mai ales asupra abolirii akineziei și ulterior asupra rigidității [40]. Horniykiewicz și colaboratorii [13, 71, 94], care au acumulat o experiență mare în acest domeniu, au observat la pacienții tratați timp îndelungat cu DOPA că nivelul DA întrece pe cel al pacienților netratați, cît și al unor metaboliți, în special 3-*O*-metil-DOPA și VMA. L-DOPA se acumulează puțin din cauza *turnover*-ului său mic în comparație cu al celorlalți metaboliți [11]. Formarea DA în urma administrării DOPA se reflectă prin creșterea concentrației VMA în urina pacienților. Creșterea DA are loc în toate regiunile creierului ce conțin enzime decarboxilante, dar depozitarea se produce numai în regiunea striatală [71].

DOPA este unul din punctele cruciale din sinteza catecolaminelor, observabil din fig. 6.1.

Scanned with OKEN Scanner

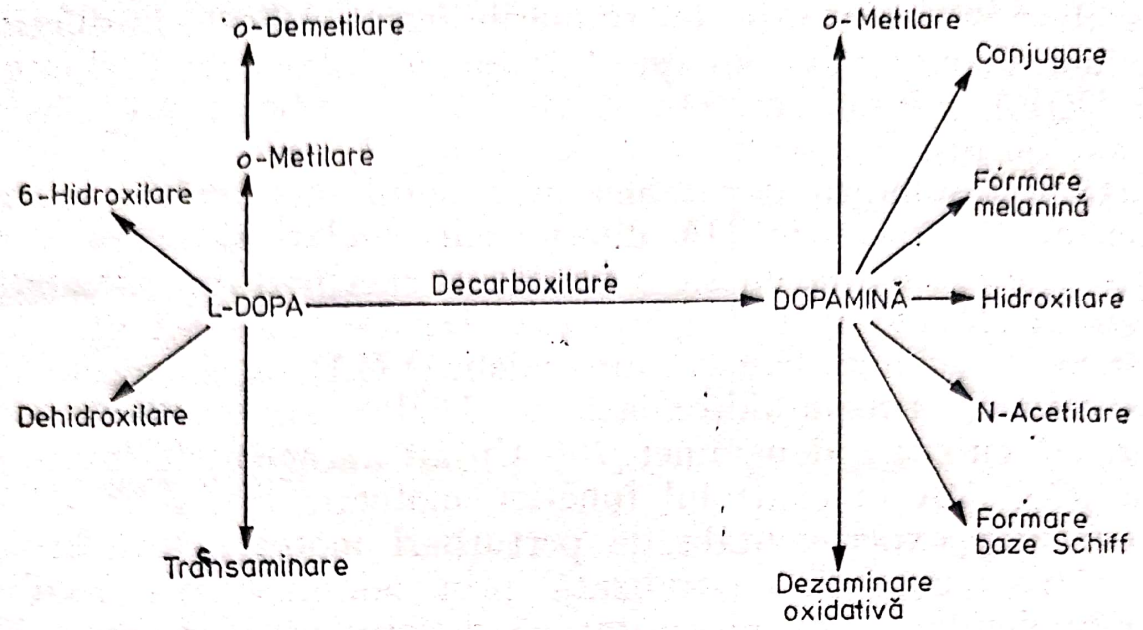


Fig. 6.4. Reacţii metabolice ale DOPA şi dopaminei

După cum reiese din fig. 6.4, atît DOPA, cît şi DA pot fi implicate în multiple reacţii metabolice, din care cauză în urma administrării DOPA apar în urină mulţi cataboliţi din care cităm: VMA, 3,4-dimetoxifeniletilamină [9], acizi *p*-hidroxifenilpiruvic [10], *m*- şi *p*-dihidroxifenilacetic, 3-metoxifenilactic [34], 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenglicol [105], cu mari variaţii individuale cantitative şi calitative. Dealtfel, răspunsul clinic la tratamentul oral cu DOPA variază considerabil după individ. În plus, apariţia acidului *m*-hidroxifenilacetic în urina pacienţilor trataţi cu DOPA indică o *p*-hidroxilare de către flora intestinală [52].

În urma tratamentului îndelungat cu DOPA se produc o serie de modificări biochimice, cum ar fi: creşterea concentraţiei NA, scăderea DOPA-decarboxilazei, a COMT, a tirozinei [87, 123, 134] din SNC sau din sînge şi ficat. În acelaşi timp s-au observat mişcări involuntare [88], sensibilitatea pacientului chiar la doze mici, represia prolactinei datorită stimulării hormonilor luteinizant [62], unele tulburări circulatorii [133]. Administrarea îndelungată de DOPA a dus la vindecări complete sau ameliorări în forma idiopatică a parkinsonismului, în manganism şi în unele stări depresive [33], dar nu în forma postencefalică sau cea indusă de unele medicamente, cum ar fi fenotiazine prin blocarea receptorului pentru dopamină. Un efect secundar care limitează aplicarea DOPA pe scară mai mare

este apariția unei stări depresive (observată și în urma administrării imipraminei) sau chiar de delirium. În acest sens trebuie menționat că unii metaboliți ai DOPA sînt halucinogeni, în special compușii 4-metilați [14].

Rezultatele negative observate în urma tratamentului cu DOPA ar putea fi explicate, cel puțin parțial, prin scăderea sintezei serotoninei (ST) [71, 127] sau a deplasării ei din depozite de către DA neoformată [40, 130].

Piridoxalfosfatul este coenzima DOPA-decarboxilazei și altor decarboxilaze și teoretic ar fi trebuit să amplifice acțiunea DOPA. Ori s-a constatat din contra o neutralizare a efectului DOPA [73]. Explicația pare să fie dată de formarea unei baze Schiff pe cale neenzimatică între piridoxal și DA, sau prin stimularea DOPA-transaminazei cu formarea acidului dihidroxifenilpiruvic în loc de dopamină. Inhibitorii MAO de tip iproniazid cresc concentrația DA din creier, dar au un slab efect terapeutic, potențînd însă acțiunea DOPA. Efectul terapeutic al DOPA este neutralizat de clordiazoepoxid, haloperidol, imipramină, trifuopromazină [76].

Administrarea unei cantități foarte mari de DOPA ridică o serie de probleme de metabolizare, deoarece s-au observat multe diferențe între căile metabolizante ale substanței endogene și cea administrată. Tratamentul sindromului Parkinson cu DOPA a deschis o nouă etapă a neurobiochimiei, dar și a unor probleme încă nerezolvate.

6.1.5. *Acțiunea centrală a catecolaminelor*

Studiul acțiunii centrale a noradrenalinei și dopaminei a cunoscut un salt uriaș în ultimii 20 ani. Lucrările mai vechi trebuie privite cu rezervă deoarece de-abia în ultimul timp s-a demonstrat că aceste amine nu pot trece bariera sînge-creier. Catecolaminele injectate direct în creier au efecte aproape opuse celor obținute prin administrare intravenoasă. Deși criticată, concepția unei bariere sînge-creier pare a fi acceptată de majoritatea cercetătorilor, mai ales după demonstrarea existenței unui larg spațiu extracelular în creierul imatur, care se contractă pe măsura maturizării [121]. Dealtfel unele enzime care inactivează catecolaminele (MAO, DOPA-decarboxilază) sînt prezente în endoteliul vascular și constituie o barieră pentru pătrunderea

Scanned with OKEN Scanner

aminelor în creier. În timp ce intrarea medicamentelor şi aminelor în creier prin bariera sînge-creier este guvernată de solubilitatea în lipide, pătrunderea prin lichidul cefalorahidian este uşurată prin injectare intraventriculară [49].

Din tabelul IV se poate observa că se poate face o asociaţie între unele stări psihice şi modificarea concentraţiei sau metabolizării NA. S-ar părea că medicamentele care provoacă eliberarea şi inactivarea NA produc sedaţie şi depresie, în timp ce substanţele care cresc concentraţia NA în creier au un efect stimulent, antidepresiv [113]. Din păcate, această relaţie este mult mai complexă şi explicarea depresiei ca o depleţie de amine ar fi o suprasimplificare. Cannon a presupus încă din 1915 că adrenalina este secretată ca răspuns la stimulări ce produc stări de furie sau emoţie. Or, relativ recent, prin injectarea intraventriculară de adrenalină la pisici s-a obţinut sedaţie, stupoare, scăderea activităţii motoare [120]. S-a observat că emoţia activă, furia, este asociată cu o excreţie crescută de NA în urină, în timp ce în stările de frică, panică, predomină excreţia adrenalinei [41]. Pentru medicamentele antidepresive s-ar părea că este esenţial păstrarea unei concentraţii relativ

TABELUL IV

Efectele psihice ale unor medicamente cu acţiune asupra metabolismului noradrenalinei

Efecte principale	*Medicament*	*Bibliografie*	*Acţiune asupra noradrenalinei*
Agresivitate	Amfetamine	[51]	Blocarea incorporării.
Stimulare		[16]	Creşte concentraţia prin scăderea dezaminării NA
Stimulare	Metil-*m*-tirozină + + iproniazid	[59,66]	MMT eliberează selectiv NA + inhibarea MAO
Stimulare	DOPA + 5-OH-triptofan + iproniazid	[126]	Eliberare amine + inhibarea MAO
Depresie	Metil-*p*-tirozină	[119]	Depleţie DA şi NA
Depresie	Rezerpină (0,5 mg pe zi)	[111]	Eliberare mare de amine
Depresie	Metil-DOPA, tetrabenazină	[38,69]	Scăderea NA din depozite
Antidepresie	Iproniazid şi alţi inhibitori MAO	[85]	Creşterea nivel NA prin inhibarea degradării
Antidepresie	Imipramină	[48]	Creşte concentraţia NA la nivelul receptorilor

crescute la nivelul receptorilor și pentru aceasta este necesară prezența unui inhibitor al MAO sau al dezaminării (amfetamine), sau prin inhibarea reincorporării prin membrană (imipramină). Dealtfel a fost un timp cînd s-a căutat să se explice acțiunea catecolaminelor prin hiperpolarizarea membranei postsinaptice. Clorpromazina ar acționa la acest nivel blocînd permeabilitatea granulelor acumulatoare de amine și deci ar avea o acțiune opusă rezerpinei [138].

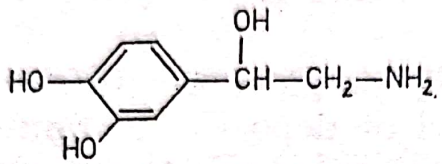
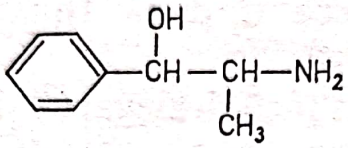
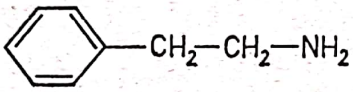
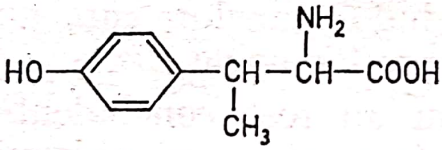
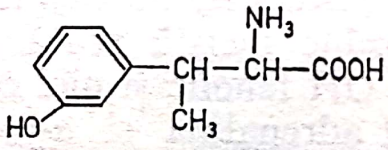
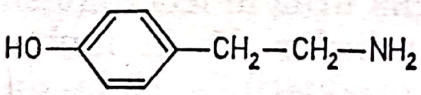
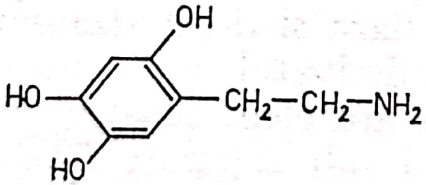
Pentru explicarea acțiunii complexe a catecolaminelor s-a admis existența a două feluri de depozite (în funcție de stabilitatea combinării cît și aceea a două tipuri de receptoare α și β, în țesuturile periferice).

Problema care nu și-a găsit încă dezlegarea și care pasionează pe mulți cercetători este aceea dacă acțiunea catecolaminelor este directă sau prin intermediul altor mediatori. Ipoteza unor dereglări în biosinteza sau degradarea catecolaminelor este foarte seducătoare, mai ales că se găsesc destui compuși intermediari ai catecolaminelor, indolaminelor, care au fost observați în cantități mici și care produc unele efecte psihice.

Dacă datele analitice nu au fost concludente în această privință, studiul unei relații între structura chimică a aminelor sau cataboliților și efect psihic merită toată atenția. Astfel feniletilamina (ce nu posedă OH fenolic și nici catenă alifatică) produce o excitație, pe cînd adrenalina și α-metil-NA produc somnolență [59]. Metil-*p*-tirozina utilă în feocromocitoame pentru limitarea producției catecolaminelor dă de multe ori tremurături de tip parkinsonian, reproductibile și la animale. Acest compus inhibă tirozin-hidroxilaza și tirozin-transaminaza ca și rezerpina [17]. În schimb, derivatul meta al metiltirozinei eliberează selectiv NA și nu are efect sedativ. S-ar părea că derivatul meta se transformă sub acțiunea DOPA-decarboxilazei în tiramină, care acționează simpatomimetic [66, 126]. *N*-metilarea noradrenalinei la adrenalină ar părea să crească capacitatea soporifică, pe cînd grefarea unui substituent mare ca izopropil produce o scădere. Substituirea la carbonul α scade potența aminei, deoarece α-metil-NA are o acțiune de cinci ori mai slabă decît a NA. Absența catenei (catecol) anihilează complet capacitatea soporifică. Capacitatea depresivă pare a fi micșorată prin substituenți la carbonul α sau în absența grupării β-hidroxil [19].

TABELUL V

Acţiunea psihică a unor compuşi naturali

Compus	*Structura*	*Efect*	*Mecanism probabil*
Noradrenalină			
Metilnoradrenalină		sedativ depresiv	
Feniletilamină		excitaţie	
Metil-*para*-tirozină		depresiv	depleţia NA şi DA
Metil-*meta*-tirozină		simpatomimetic	inhibarea tirozinhidroxilazei
Tiramină		simpatomimetic	depleţie NA
6-Hidroxidopamină		schizofrenie (?)	distrugerea fibrelor adrenergice

Aminele excitante au de asemenea o catenă alifatică ataşată de un radical aromatic (fenil, indolil), alifatic (triaminoheptan). Aminele se leagă de receptori atît prin catenă, cît şi prin ciclul aromatic, probabil prin forţe van der Waals. S-au emis ipoteze interesante despre acţiunea stimulatorie sau depresivă a derivaţilor catecolaminelor, în funcţie de prezenţa unei grupări chimice. Astfel prezenţa unor substituenţi negativi

(OH, CH_3O, Cl) ar determina o acțiune depresivă printr-o combinație de tip electrostatic, în timp ce un substituent pozitiv (CH_3) ar produce excitație. Deși grupările fenolice ale aminelor simpatomimetice sînt puțin ionizate la *p*H fiziologic, diferențele între depresivi ca α-metil-NA și excitanți (amfetamine) aproape identice structural pot fi datorate lipsei unui hidroxil fenolic ce modifică proprietățile electronice ale moleculei.

Introducerea experimentală a 6-hidroxidopaminei prin injectare directă în SNC a adus informații interesante [28, 112] prin distrugerea selectivă a fibrelor adrenergice, cu implicarea posibilă în etiologia schizofreniei [135]. Totuși, stările depresive trebuie înțelese ca apărînd la mai multe nivele simultan, producîndu-se o interacție multiplă a unor factori genetici, comportamentali, individuali, ce au la bază un lanț de modificări biochimice. Cert este că o creștere a nivelului catecolaminelor libere în creier este eficace în depresie. Antidepresivi triciclici ca imipramina, amitriptilina previn reincorporarea aminelor în depozitele presinaptice, iar inhibitorii MAO, iproniazid, tranilcipromina, fenelzina prevenind dezaminarea cresc accesibilitatea aminelor la nivelul receptorilor. Prin tehnica inhibării transportului prin bariera sînge-creier datorită probenecidului s-a observat o scădere a aminelor libere din creier în stări depresive [54, 56].

Dacă depresia ar fi declanșată printr-o depleție de catecolamine, mania ar fi produsă printr-o creștere masivă. Astfel depresia și mania ar fi două stări opuse bazate pe aceeași dereglare asociată cu o instabilitate a membranei presinaptice neuronale corectabilă parțial prin imipramină sau săruri de litiu [27]. Dacă instabilitatea membranei neuronale ar fi un factor major în etiologia dereglărilor funcționale, orice deficit enzimatic ar putea orienta reacțiile metabolice. Acumularea ionilor de sodiu intraneuronal demonstrată încă din 1963 de Cappen și Show [30] în stări depresive s-a dovedit declanșatoare în eliberarea extraneuronală a catecolaminelor [97]. Astfel predispoziția ereditară localizată la nivelul unei gene ar duce la o sinteză defectuoasă a unei enzime, implicată în metabolismul catecolaminelor, fie al membranei (ATP-ază).

6.2. Serotonina

5-Hidroxitriptamina sau serotonina (ST) este prezentă aproape pretutindeni la animale, plante şi bacterii. Creierul conţine aproape 1% din ST totală a unui animal, cea mai mare cantitate găsindu-se în hipotalamus [127] (aproximativ 1,7 μg/g), hipofiză (20 μg/g), sistemul limbic etc. Localizarea ST este oarecum asemănătoare cu aceea a acetilcolinei, cu diferenţa că aceasta din urmă este legată de particulele terminaţiilor nervoase mici, iar ST de cele mari [101].

Biosinteza serotoninei porneşte de la triptofan (fig. 6.5) pe calea 5-hidroxitriptofanului [114], în urma acţiunii triptofan hidroxilazei (E.C. 1.14.3.2), enzima limitantă. După Bhagovan et al. [22], în tractul gastrointestinal, triptofan-decarboxilaza ar fi enzima limitantă a biosintezei ST. Activitatea triptofan hidroxilazei depinde de prezenţa pteridinei reduse, a oxigenului şi este inhibată selectiv de *p*-clorfenilalanină, compus care *in vivo* produce o insomnie prelungită [89] şi o scădere a ST din creier.

În această familie de compuşi, aproape toţi membrii au proprietăţi active asupra SNC. Astfel chiar *L*-triptofanul pare să aibă proprietăţi antidepresive, mai ales în asociaţie cu un inhibitor al MAO [30]. S-ar părea că în creierul mamiferelor concentraţia normală de triptofan este sub valoarea constantei K_M pentru triptofan-hidroxilază şi în acest caz schimbări în concentraţia intraneuronală va influenţa biosinteza ST [96]. Compusul următor format, 5-hidroxitriptofanul, are proprietăţi stimulatorii asemănătoare amfetaminelor [78], sau produce stări de furie, catatonie.

Etapa următoare a biosintezei ST este catalizată de 5-hidroxitriptofan-decarboxilază (E.C. 4.1.1.26) avînd drept coenzimă piridoxalfosfat, din care cauză în avitaminoza vitaminei B_6, concentraţia ST scade cu o treime. Serotonina posedă proprietăţi multiple, atît periferice (efect constrictor în peristaltism), cît şi centrale. Serotonina nu poate traversa bariera sînge-creier, aşa că rolul ei central este explicat prin acţiunea (uneori nespecifică) a unor medicamente. Astfel inhibitorii de MAO, (iproniazid) ca şi rezerpina (prin depleţie) micşorează concentraţia ST din creier, pot produce turburări psihice, mai ales în concentraţii mari. Serotonina poate fi acetilată în prezenţa acetil-coenzimei A, cu formarea de *N*-acetil-ST, ca apoi sub

acțiunea *O*-metilindol-transferazei să producă melantonina, compus cu rol neurofiziologic neclar. Distrugerea neuronilor adrenergici cu 6-hidroxidopamina nu afectează sistemul serotoninergic, din contra, pare să stimuleze sinteza și utilizarea ST[117].

O serie de stupefiante cu structură asemănătoare ST acționează antagonist, cel puțin periferic, ex. mescalina, bulbocapnina, bufotenina, iohimbina și alcaloizii ergotului de secară, LSD. Acești halucinogeni par să acționeze asupra receptorilor centrali [136]. Dimetiltriptamina este un halucinogen mai puternic decît LSD și mescalina. Dealtfel Axelrod [5] a demonstrat formarea bufoteninei (*N*, *N*-dimetilserotonină) și a *N*, *N*-dimetil-

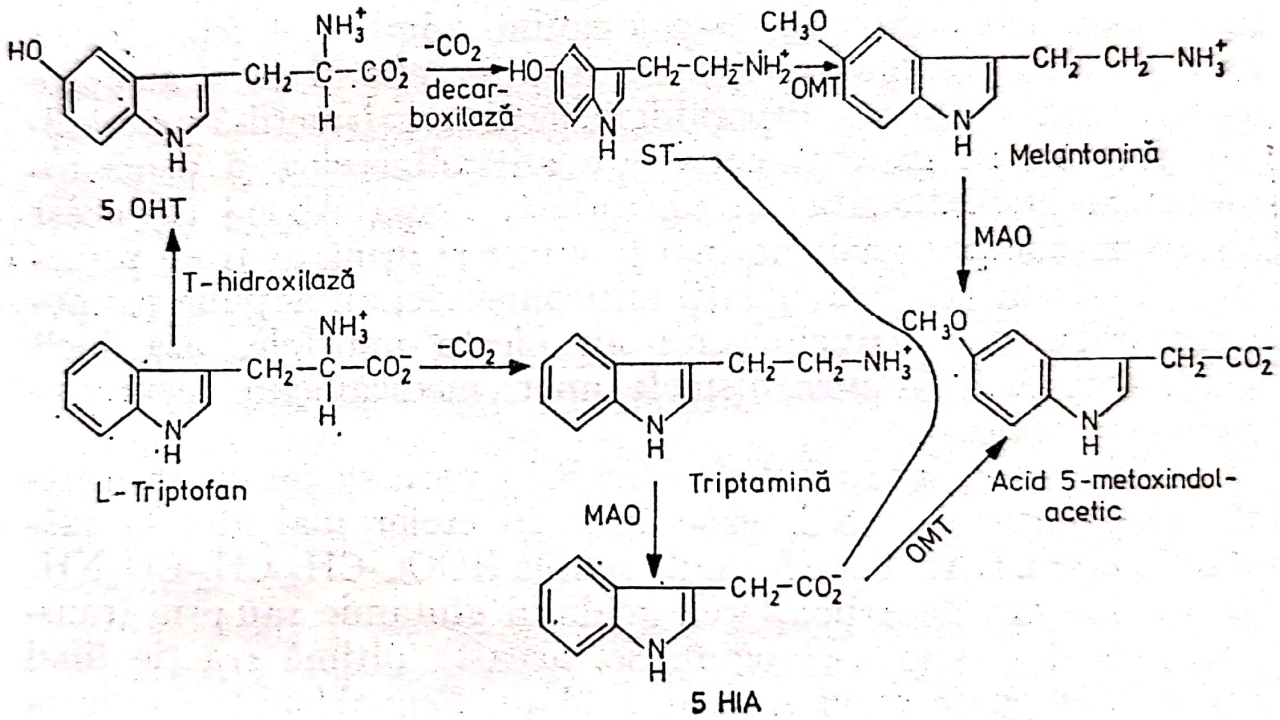


Fig. 6.5. Metabolismul schematic al serotoninei.

Legenda: T = *L*-triptofan; 5-OHT = 5-hidroxitriptofan; ST = Serotonină; 5-HIA = Acid 5-hidroxindolacetic; Trip. = triptamină; OMT = *O*-metilindol-transferază.

triptaminei din ST și triptamină cu ajutorul *S*-adenozilmetioninei ca donor de grupări metil. *N*-metilarea aminelor biologice joacă, se pare, un rol nebănuit în patologia bolilor mintale [8]. Acidul metiltetrahidrofolic poate de asemenea metila eficace ST, producînd 5-metoxitriptamina, compus în concentrație mare în hipotalamus sau 5-metoxi-*N*, *N*-dimetiltriptamina, care pare a fi un agent psichedelic [8]. Serotonina liberă pare a fi implicată în producerea somnului dominat de sistemul limbic, bogat în acest mediator chimic [19, 118].

6.3. Alţi mediatori chimici

Acetilcolina este eliberată la capetele terminaţiilor nervoase parasimpatice sub acţiunea unui impuls, difuzează printre sinapse şi ajunge la receptorii de pe suprafaţa neuronilor unde este absorbită. Acţiunea directă, centrală, a acetilcolinei nu este totuşi clară. Astfel, prin aplicarea directă în creier a acetilcolinei (Ach) se produc modificări în comportare, iar la schizofrenici măreşte severitatea bolii [60].

Inhibitorii colin-esterazei, de tipul compuşilor organofosforici (paration), în doze subletale produc modificări în comportare. O serie de halucinogeni de tipul muscarinei, atropinei, sînt agenţi anticolinergici potenţi, deşi paralelismul dintre cele două activităţi nu este unanim admis [14, 39]. Totuşi agenţii anticolinergici activi au fost sintetizaţi prin analogie cu structura Ach [22]. Piperidilglicolaţii (ex. 1-metil-3-piperidilbenzilat) au în general activitate anticolinergică şi psichotomimetică antagonizată de piperidină. După Abood [1] acest din urmă compus găsit normal în creier şi urină ar fi un psihotrop endogen. Nu toţi agenţii anticolinergici au acţiune psichotomimetică, iar halucinogenii au efecte multiple, aşa încît implicarea Ach în mecanismele unor medicamente neuropsihice este confuză.

Acidul gama-aminobutiric (GABA) pare să fie un transmiţător inhibitor în SNC, găsindu-se în creier mai ales în *substantia nigra*. GABA are formula simplă $HOOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2NH_2$ şi provine din decarboxilarea acidului glutamic sau prin transaminare din acid α-cetoglutaric, această ultimă reacţie fiind reversibilă poate servi şi la degradare. Semialdehida succinică şi acid 4-hidroxibutiric, intermediari în această reacţie, pot produce prin injectare somn [42]. Alcaloidul bicuculina ce produce convulsii epileptiforme de origină corticală este un antagonist puternic şi specific al inhibiţiei produse de GABA [110]. Diazepamul, tranchilizant şi anticonvulsivant, produce o creştere a GABA cerebral [110]. Deşi evidenţa experimentală este încă insuficientă, s-ar părea că GABA produce o hiperpolarizare a neuronilor din cortexul cerebral prin mecanism de membrană identic cu cel observat în cursul inhibării sinaptice [106]. Astfel s-au găsit relaţii interesante între modificările concentraţiei GABA cerebrale şi variaţia conductivităţii ionilor de clor şi potasiu din membrana postsinaptică, mai ales după administrarea de alcool etilic [13].

Scanned with OKEN Scanner

6.4. Agenți halucinogeni

Existența unei baze biochimice pentru explicarea unor boli neuropsihice este foarte atrăgătoare atît din punct de vedere teoretic, cît și prin găsirea unui tratament mai logic. În acest sens, halucinogenii, agenți psichotomimetici, psichedelici, sînt substanțe chimice, care în doze netoxice produc temporar modificări ale gîndirii, percepției, comportamentului, însoțite de confuzii mintale. Halucinațiile pot fi complicate prin senzații auditive sau luminoase, de stări alternante de euforie și apatie. Majoritatea halucinogenilor se găsesc în plante și ciuperci, fiind folosite încă de pe vremea omului primitiv în scopuri magice, rituale, medical empirice în toate continentele. Studiul acestor substanțe cunoaște o mare amploare din cauza necesității medicilor de a cunoaște „stările" în care se găsesc pacienții în criză, a posibilităților de tratament, iar biochimic, datorită asemănării frapante structurale cu unii compuși naturali.

Deși halucinațiile produse de acești agenți variază foarte mult după tipul constituțional, temperament sau chiar gradul de cultură [36, 67], sînt foarte asemănătoare simptomelor schizofreniei acute. În consecință, după cum am mai menționat, în ideea existenței unui metabolism viciat în tulburări neuropsihice, a fost cercetată urina acestor pacienți în speranța găsirii evidenței unor cataboliți diferit calitativ. Cu toate numeroasele comunicări [19, 116, 133], rezultatele nu sînt încă semnificative.

Formulele principalilor agenți halucinogeni sînt prezentate în fig. 6.6, alături de acele ale unor compuși naturali pentru comparație.

Asemănarea structurală dintre unii halucinogeni și aminele simpatomimetice a intrigat pe mulți cercetători, studiindu-se printre altele efectul diferitelor substituții în nucleul indolic. După cum reiese din fig. 6.6, există o certă asemănare de structură între unii compuși naturali (triptofan, serotonină, adrenalină) și unii halucinogeni cum sînt mescalina, bufotenina, psilocibina. În cazul harminei, ibogainei sau LSD-ului, în formula lor este observabilă prezența aceluiași nucleu indolic [97].

Astfel s-a găsit prin studii de sinteză că hidroxilul adrenalinei din poziția 3 a nucleului este legat de proprietăți presoare și că modificarea lui în derivat metoxi (OCH_3) crește activitatea psichomimetică, iar îndepărtarea OH din nucleu produce

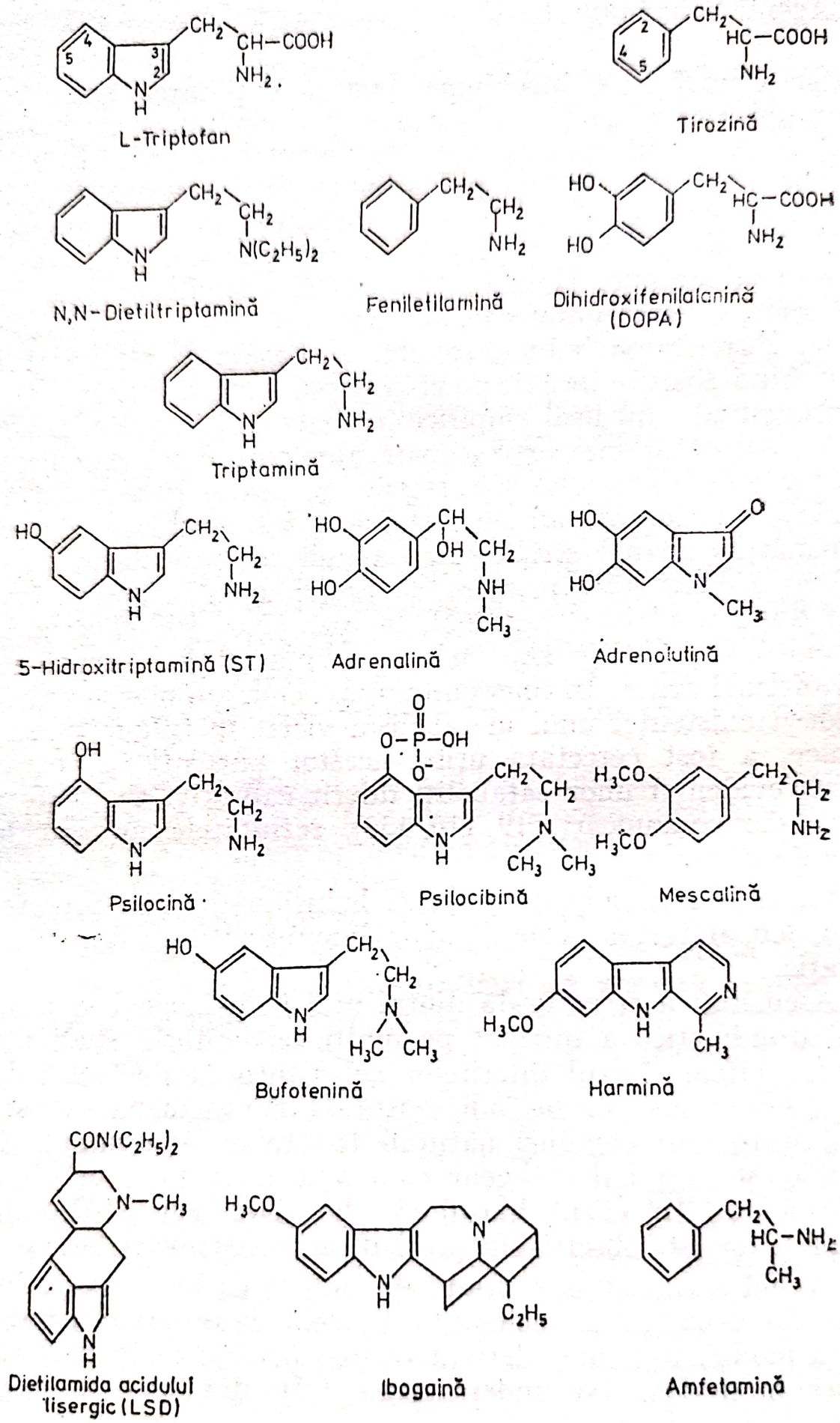


Fig. 6.6. Agenţi halucinogeni înrudiţi cu compuşii naturali

compuși asemănători amfetaminelor. Derivații metoxi pierd proprietățile simpatomimetice, în schimb predomină cele catatonice și halucinogene (mescalină). Formarea unui al doilea ciclu din metilul catenei legat în poziția 6 a nucleului benzenic produce compuși de asemenea activi psihomimetici exemplu adrenocromul, adrenolutinul sau izochinolina. Poziția 4 a nucleului indolic pare să fie legată de activitatea psihomimetică; psilocina (4-hidroxitriptamina) are proprietăți mult schimbate față de serotonina (5-hidroxitriptamina), iar fosforilarea observată în cazul psilocibinei oferă capacitatea halucinogenă. LSD are această poziție incorporată în două cicluri formînd legături foarte stabile [63].

Calcularea orbitalilor atomici ai derivaților indolici a arătat că pozițiile 4, 5 și 6 au o mare afinitate pentru reacții cu electrofili de tip oxidril, amidă, imidazol ai eventualilor receptori [58]. Studiul densității electronice a evidențiat corelații interesante între activitatea psihotropă și centrii cu cea mai mare densitate electronică din molecula halucinogenilor [118].

Studiile structurale au permis sintetizarea unor derivați amfetaminici, psichotomimetici, mult mai puternici decît cei naturali; astfel 3,4,5-trimetoxifenilisopropilamina (TMA) sau 2,5-dimetoxi-4-metilamfetamina, care este de 100 ori mai potentă decît mescalina.

Metabolizarea halucinogenilor nu este cunoscută decît în linii mari datorită, printre altele, și existenței unor reacții multiple. Astfel mescalina este excretată parțial netransformată și parțial ca produs dezaminat, 3,4,5-acid trimetoxifenilacetic, dar și prin alți compuși. Psilocibina este defosforilată de fosfataza intestinală în psilocină, care suferă apoi o metabolizare puțin cunoscută. În urină s-a găsit 25% din radioactivitatea inițială sub formă nemetabolizată, 10% demetilată și 15% ca acid 4-hidroxindolacetic [61, 83]. Morfina este dezactivată în special prin conjugare cu acid glucuronic, *N*-demetilarea fiind de mică importanță. S-ar părea că dezvoltarea toleranței la morfină nu se datorește metabolizării deoarece administrarea unor cantități mari la șobolan produce inhibarea glucuronosiltransferazei și *N*-demetilazei, enzime implicate în dezactivarea metabolică [36]. Heroina (3,6-diacetilmorfina) este diacetilată în morfină. Metabolizarea triptaminei (compus inactiv) ridică probleme interesante, deoarece acest derivat al triptofanului poate fi hidroxilat în pozițiile 4, 5, 6, 7, metilat, acetilat sau

oxidat; ori metilarea în poziția 6 observată deja în condiții fiziologice poate duce la formarea *N,N*-dimetiltriptaminei, halucinogen puternic.

Desigur, cele mai interesante perspective pot fi obținute prin studierea modificărilor calitative sau cantitative ale unor compuși naturali în urma administrării acestor droguri. Din păcate, cu toată existența unor numeroase date, datorită interferenței cu multe procese biochimice, nu reiese o linie clară de acțiune. În organismul aflat sub acțiunea drogurilor se produce o stare de stress, în care o serie de mecanisme fiziologice și biochimice sînt declanșate nespecific: midriasis, scăderea presiunii sanguine, tahicardie, creșterea nivelului sanguin a unor hormoni și, desigur, eliberarea catecolaminelor din medulosuprarenală mai ales. Pe fondul acestui tablou este greu de diferențiat o modificare caracteristică. Mai clară pare să fie scăderea excreției de fosfați în urină, observată după administrarea diferitelor tipuri de droguri, și fapt mai interesant, de asemenea găsită în urina schizofrenicilor sau la persoanele cărora li s-a injectat adrenolutină, derivat al adrenalinei [67]. Această retenție de fosfați, neexplicată încă, ar putea sugera o legătură cu depozitarea catecolaminelor, care după cum am relatat este dependentă de sistemul ATP-ATP-ază și deci de metabolismul fosfaților.

Observațiile efectuate pe un parametru biochimic, enzimă sau catabolit, nu sînt concludente și greu de interpretat datorită interrelațiilor multiple. Deși neexplicată, dar interesantă ar fi ipoteza scăderii utilizării metabolice a glucozei [85, 99], scăderea șuntului pentozofosfat [35] și corelarea cu eficiența administrării acidului nicotinic la schizofrenici. Într-adevăr șuntul pentozofosfat este unica sursă de riboză necesară biosintezei coenzimelor nicotinamidice de tip NADH, NADPH.

Mai promițătoare par să fie observațiile legate de creșterea permeabilității membranelor, în special a barierei hematoencefalice, în urma acțiunii drogurilor. Această creștere a permeabilității permite atît trecerea unor compuși toxici sau a unora fiziologici, dar toxici SNC, în cantitate mare. Astfel adrenalina injectată parenteral crește presiunea sanguină și glicemia, fără să afecteze funcțiile creierului, așa cum se produce printr-o injectare direct în ventriculii cerebrali. Dealtfel Heath [64] a remarcat că serul recoltat de la schizofrenici, amestecat cu albastru tripan, permite trecerea colorantului în creier. Tot

legat de apariția unor compuși toxici, menționăm extragerea taraxeinei, singurul halucinogen format în organism în condiții nelămurite și cu o structură necunoscută, probabil o proteină conjugată cu o amină [19].

În tabelul VI sînt prezentate cîteva proprietăți biologice ale unor halucinogeni. Așa cum s-a mai amintit, triptofanul produce manifestări psihice doar la concentrații mari, dar neavînd acțiunile biologice ale halucinogenilor puternici. α-metiltriptofanul activ neuropsihic, inhibă glutamat-decarboxilaza, cît și MAO, împreună cu harmalina. După toate probabilitățile, acțiunea halucinogenilor se manifestă la mai multe nivele, acționînd fie direct, fie prin eliberarea în cantitate mare a aminelor simpatomimetice. O astfel de acțiune ar fi plauzibilă, ținînd seama de efectele acestor amine injectate direct în creier, cît și de perturbările permeabilității membranelor produse de halucinogeni.

TABELUL VI

Acțiunea unor substanțe psihotrope

Efecte / *Compuși*	*L-Triptofan*	*Triptamină*	*ST*	*DMT*	*DET*	*Bufotenină*	*Harmalină*	*Psilocilină*	*LSD*
Manifestări psihice	+	±	±	+	+	+	+	+	+
Inhibitor-esteraze	—	+	+	+	+	+	—	+	+
Substrat MAO	—	+	+	+	+	+	—	+	—
Inhibitor MAO	—	—	—	—	—	—	+	—	
Inhibitor glutamat-decarboxilază	—	—	—	—	—	—	—	—	
Serotonin antagonist	—	+	—	+	+	+	+	+	+
Blocant sinaptic	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Schimbări electroencefalografice	—	+	—	+	+	+	+	+	+
Depleția catecolaminelor	—	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: + = acțiune pozitivă; — = acțiune negativă; ST = 5-hidroxitriptamină (serotonină); DMT = *N*, *N*-dimetiltriptamină; DET = dietiltriptamină; LSD = dietilamida acidului lisergic.

Trebuie menţionat că inhibitorii MAO (iproniazid, nialamidă, amfetamine) sînt agenţi euforizanţi şi potenţează acţiunea halucinogenilor. Inhibitorii MAO menţionaţi n-au efecte la schizofrenici şi alcoolici, la care cantitatea de halucinogen necesară producerii unei crize este de 2—4 ori mai mare decît la un individ normal. Toate aceste date sugerează existenţa unei legături destul de directe între crizele schizofrenicilor şi cele provocate la persoane sănătoase prin halucinogeni. În acest context n-ar părea surprinzător vindecările unor schizofrenici prin administrarea unor halucinogeni [67, 102]. Încheiem partea destinată acţiunii acestor substanţe amintind că ele au o acţiune mult mai complexă, nu numai la nivelul SNC, din moment ce produc stări caracteristice la paianjeni, viermi, gasteropode, peşti, păsări şi bineînţeles mamifere.

6.5. Fenotiazine

Introducerea clorpromazinei în terapeutică a însemnat o cotitură, datorită succeselor spectaculoase obţinute în multe domenii. Acest compus posedă proprietăţi terapeutice în funcţie de doză, acţionînd ca antipsihotic, tranchilizant, antiemetic, antihistaminic, antibacterian, hipotermizant, antiseptic local etc. Literatura existentă despre acest medicament pare să cuprindă peste 6000 articole, aşa încît este imposibil de făcut o recenzie, chiar evitînd menţionarea celorlalţi derivaţi fenotiazinici.

Numai prin enumerarea indicaţiilor terapeutice devine evidentă acţiunea acestui medicament asupra tuturor organelor, iar metabolizarea se face prin mai multe căi, în urină detectîndu-se peste 20 derivaţi.

Totuşi efectele principale sînt la nivelul SNC, dar şi aici, în timp ce la doze moderate produce somn sau sedaţie, în concentraţie mare clorpromazina declanşează simptome extrapiramidale asemănătoare parkinsonismului. Imaginea electroencefalografică este asemănătoare aceleia din somn.

Clorpromazina ridică probleme chiar din punct de vedere al arhitecturii moleculei, care cu toate studiile efectuate nu şi-a desvăluit încă toate proprietăţile. Această substanţă este un donor de electroni puternic, cu electroni delocalizaţi ocupînd numai orbitalii de legătură. Totuşi această proprietate nu a putut fi implicată în explicarea efectelor biologice. Oxidarea

Scanned with OKEN Scanner

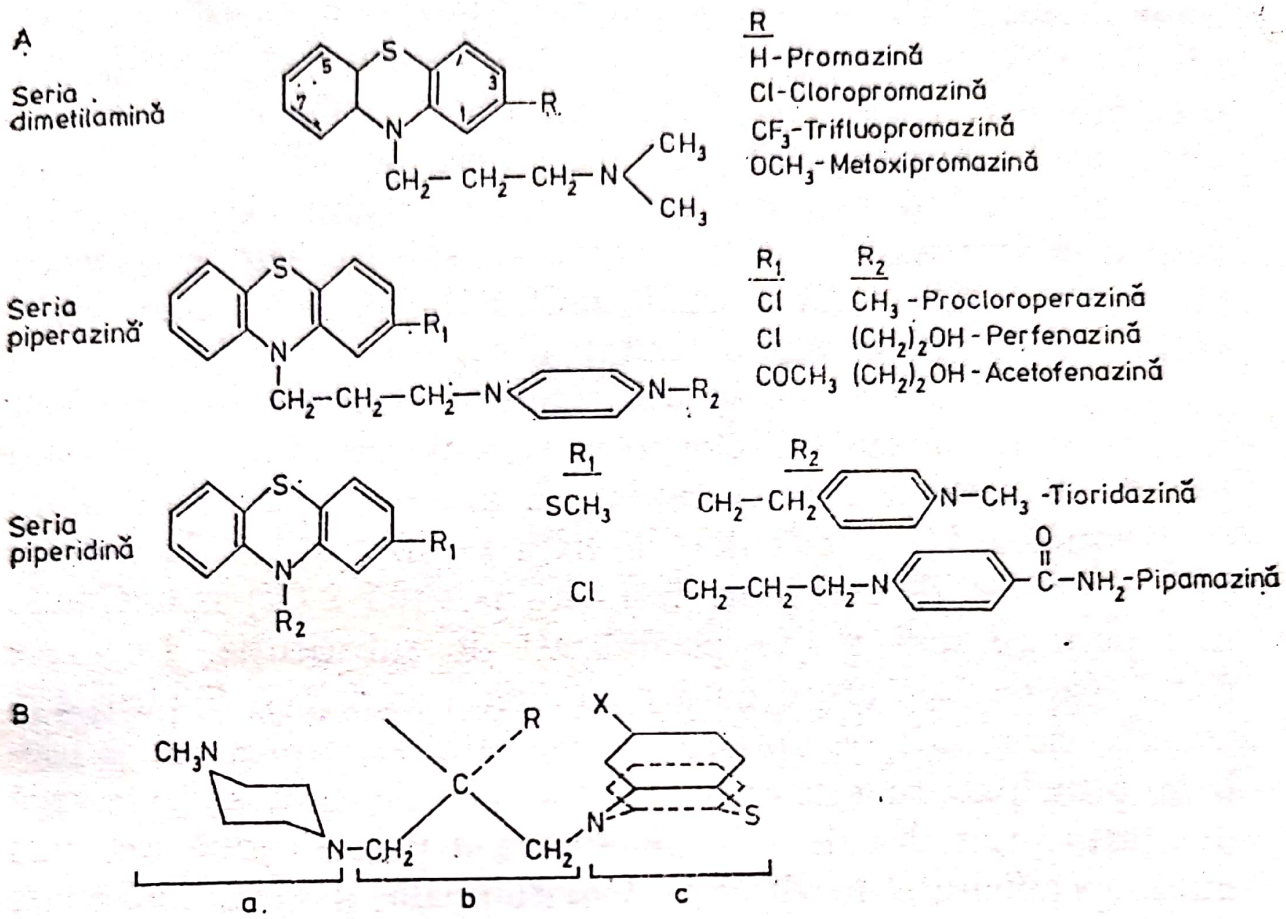


Fig. 6.7. Compuşi fenotiazinici; A. clasificarea fenotiazinelor; B. model tridimensional al clorpromazinei

clorpromazinei are loc în două trepte univalente, consecutive, care presupun formarea unor compuşi intermediari cu structură semichinoidă cu caracter de radicali liberi. De aceea, molecula de clorpromazină prezintă proprietăţi caracteristice de excitaţie prin chemiluminiscenţă sau afectînd acelea ale altor molecule cum ar fi riboflavina, acridina, rodamina-B [122]. Cu toate acestea, fenotiazinele sînt excelenţi captatori (*„scavengers"*) de radicali liberi în sisteme biologice [115].

Studiul diferitelor substituţii în nucleul fenotiazinic a permis obţinerea unei largi familii de derivaţi cu multiple acţiuni terapeutice, din care cei care posedă activitate tranchilizantă sînt prezentaţi în fig. 6.7. Astfel înlocuirea catenei dimetilaminopropil de la N_1 din prima serie cu metilpiperazinopropil din a doua serie creşte activitatea şi scade toxicitatea. Compuşi şi mai activi s-au obţinut prin substituirea la N_1 cu o catenă cuprinzînd nucleul piperidinic (seria a treia, fig. 6.7). Substituirile în poziţia 2 a nucleului fenotiazinic au permis obţinerea

altor derivaţi. Datorită efectelor multiple terapeutice chiar la nivelul SNC (efecte asupra reflexelor condiţionate sau necondiţionate, catalepsiei, scăderea activităţii motoare, potenţarea altor medicamente etc.) prin diferitele substituţii se obţin derivaţi avînd o mare diferenţiere de acţiune. De exemplu, pentru scăderea activităţii motoare, substituirile se succed în ordinea $CF_3 > Cl > OCH_3 \approx CONH_2$. Catene mai mari grefate la C_2 micşorează activitatea, sugerînd necesitatea menţinerii unei libertăţi de rotaţie. Studii interesante au oferit desfăşurarea moleculei de clorpromazină în spaţiul tridimensional (fig. 6.7 B). Astfel specificitatea cea mai mare pare să fie dată de porţiunea *b* a moleculei datorită posibilităţilor de ataşare în trei puncte de receptor. Datorită poziţiei 2 (*X*) mai expuse sînt permise mai multe posibilităţi de substituţie. Deoarece ciclul fenotiazinic are o cută de-a lungul axei *N* — *S*, poziţia *X* nu este chiar atît de aproape de suprafaţa receptorului şi probabil principala funcţie ar fi să influenţeze densitatea electronică din jurul atomului de sulf. Porţiunea *a* pare să aibă cea mai mică specificitate în direcţie longitudinală şi ceva mai mare de-a lungul axei transversale. Aceasta indică probabil că molecula se potriveşte unei scobituri înguste. Se poate ca grupările terminale ale catenei să aibă rolul de a micşora bazicitatea atomului de N din poziţia 1. Suprafaţa în care se potriveşte porţiunea *a* a catenei pare să fie destul de mare din moment ce se admit substituţii de felul celor din seria a doua şi a treia (fig. 6.7.)

Studierea structurii moleculei sau a diferitelor substituiri au permis doar obţinerea unor largi game de derivaţi, fără a se îmbogăţi prea mult cunoştinţele teoretice asupra acestui ciclu extrem de interesant.

Din punct de vedere biochimic cunoştinţele sînt şi mai puţin avansate. Din multitudinea articolelor publicate în această direcţie vom încerca să prezentăm o ipoteză mai unitară. Astfel, studiul metabolizării a indicat rapiditatea încorporării clorpromazinei în creier, prin străbaterea cu uşurinţă a barierei hematoencefalică. Mai mult de jumătate din medicament se găseşte în fracţiunile microzomială şi supernatant a celulei.

Scanned with OKEN Scanner

Metabolizarea clorpromazinei este extrem de complexă, depinzînd de specie: la iepuri și cobai medicamentul nu este prea activ, fiind metabolizat rapid mai ales prin hidroxilare; la șoareci și șobolan, foarte sensibili, s-au observat mari cantități de medicament netransformat, iar la om, ocupînd o poziție intermediară, pare să predomine sulfoxidarea localizată mai ales în microzomi [50, 116]. Predominarea unei căi metabolice nu exclude existența altor variante și nici variația cantitativă între ele. Dacă ținem seama numai de patru reacții: demetilare, hidroxilare, formarea sulfoxizilor și a conjugaților cu acidul glucuronic sînt postulați 16 metaboliți greu de izolat [16, 106].

Desigur, în primul rînd trebuie să se țină seama de capacitatea clorpromazinei ca donor de electroni, de a da complexe cu transfer de sarcină [60], cît și de observarea unor radicali liberi de structură semichinoidă [39], observabili prin rezonanță magnetică nucleară [47, 108]. Aceste proprietăți ar explica afinitatea clorpromazinei pentru blocarea unor coenzime ca FAD, NAD, NADP prin formarea unor complecși cu transfer de sarcină, demonstrate *in vitro* [131], cît și scăderea acestora *in vivo* [91]. Se pare că medicamentul are o acțiune directă asupra coenzimelor, prin fixare, cît și una alosterică la nivelul grupărilor acide nespecifică și sensibilă la lumină [125]. Acțiunea asupra coenzimelor ar putea explica modificările multor procese metabolice, cum sînt utilizarea glucozei [95] sau fosforilarea oxidativă [3], modificate în urma administrării clorpromazinei. Acțiunea asupra proceselor metabolice poate avea loc la nivelul coenzimelor necesare acțiunii enzimelor, asupra enzimelor implicate în aceste procese (observabile pentru o serie de dehidrogenaze [132], sau asupra membranelor celulare și subcelulare.

Implicarea clorpromazinei în permeabilitatea membranelor subcelulare a fost clar demonstrată prin inhibarea umflării mitocondriilor și a peroxidării lipidelor din membrane asociată acestui proces [115], posibil prin blocarea grupărilor sulfhidril din membrane [37, 86]. Variațiile catecolaminelor și a altor amine simpatomimetice observate în urma administrării clorpromazinei ar putea fi explicate tot printr-o acțiune asupra membranelor celulare sau subcelulare, datorită marii afinități pentru lipoproteine [115]. Dealtfel, blocarea absorbției catecolaminelor din neuroni de către clorpromazină a fost demonstrată [21].

Scanned with OKEN Scanner

Așa cum studiile biochimice, farmacodinamice sînt departe de a fi epuizate în acest domeniu și posibilitățile terapeutice, asocierea cu alte medicamente a clorpromazinei și derivaților săi oferă noi și multiple studii.

6.6. Amfetamine

Dacă la persoane normale amfetaminele și stimulatorii înrudiți ai SNC produc efecte trecătoare și foarte variate, la schizofrenici aceste substanțe au o acțiune în funcție de doză. Astfel la concentrații mari declanșează o psihoză greu de deosebit clinic de schizofrenie acută paranoidă, iar în doze foarte mici exacerbează selectiv simptomele schizofreniei. Psihoza produsă de amfetamine este deseori observată la drogați ce folosesc cantități mari. Un alt factor în favoarea asocierii perturbărilor nervoase produse de amfetamine și schizofrenie este acțiunea spectaculoasă neutralizantă a fenotiazinelor și butirofenonelor asupra psihozei declanșate de amfetamine, în timp ce barbiturații nu au efect [71, 132].

Legătura structurală izbitoare între amfetamine și catecolamine (fig. 6.6) a sugerat un mecanism de acțiune a acestor substanțe pe calea acestor neurotransmițători. Dovezi destul de neconcludente s-au acumulat doar din punct de vedere al comportării comparate și al modificărilor morfopatologice. Biochimic, s-au observat unele modificări, cum sînt: creșterea concentrației NA și scăderea derivaților dezaminați ai catecolaminelor sau a serotoninei și acidului 5-hidroxindolacetic. Inhibarea reacțiilor de hidroxilare (în special ale triptofanului) nu poate explica acțiunea amfetaminelor [37]. Pe de altă parte, s-au semnalat modificări indirecte și în cazul altor neurotransmițători cum ar fi acetilcolina (fitostigmina, un inhibitor al acetilcolin-esterazei, are efect protector) sau dopaminei (folosirea L-dopa în cantități mari dă o psihoză asemănătoare cu cea produsă de amfetamine). Cocaina, care mărește concentrațiile NA și DA din creier, produce de asemenea o psihoză aproape identică cu aceea dată de amfetamine. Ca și în cazul fenotiazinelor, multiplele posibilități de reacție a amfetaminelor, diferența mare în acțiune a izomerilor optici, marea variație în răspuns în funcție de specie și individ complică și mai mult interpretarea rezultatelor investigațiilor biochimice, cît și a celor psiho-terapeutice.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 7

MECANISME BIOCHIMICE ÎN RADIOPROTECȚIE ȘI RADIOSENSIBILIZARE

7.1. Boala de iradiere

Creșterea aplicațiilor pașnice ale energiei nucleare în industrie, agricultură, biologie, cît și extinderea folosirii unor doze mari în tratamentul radiologic măresc riscurile unor accidente. Radiațiile ionizante au o acțiune extrem de complexă asupra organismelor vii, fiind influențate aproape toate procesele metabolice importante, desigur în funcție de doză, debit și natura radiațiilor. Nu vom insista asupra manifestărilor clinice ale bolii de iradiere (diaree, febră, astenie), hematologice (leucopenie, trombocitopenie) sau morfologice (aberații cromozomiale). Aceste manifestări, ca și cele biochimice, au o specificitate redusă și diferă mult cu specia, rasa sau chiar după individ.

Cu tot efortul mare depus în multe țări, în ciuda unui vast material descriptiv acumulat, interpretările leziunilor și modificărilor biochimice rămîn încă controversate. Din păcate, majoritatea lucrărilor au studiat variația cantitativă a unui parametru biochimic, izolat, neținînd seama de marea interdependență a reacțiilor biochimice, de reglarea lor.

O linie de cercetare care a dominat multă vreme studiile în acest domeniu a fost găsirea unei leziuni mai mult sau mai puțin specifice. Ipoteza unei „ținte" *(target)* preferențiale a radiațiilor ionizante a orientat numeroase lucrări spre domeniul acizilor nucleici, în special al acidului dezoxiribonucleic (ADN). Modificările cromozomiale ce pot fi observate uneori au fost corelate cu determinări calitative și cantitative ale ADN și metaboliților respectivi. Ulterior, prin aprofundarea studiului s-a găsit că procesele de refacere celulare sau macromoleculare sînt destul de intense (la doze moderate) pentru a neutraliza leziunile inițial observate [149]. În primele ore și pînă la 24—48 ore după o iradiere acută ce depășește DL_{50} se observă

multe modificări biochimice, fiind afectate aproape toate marile grupe ale proceselor metabolice.

În continuare, urmează apoi o perioadă de stare, a cărei durată variază cu factorii menționați, timp în care organismul luptă pentru repararea leziunilor inițiale, în cadrul căreia se instalează supraviețuirea sau apar complicații hematologice, intestinale sau pulmonare.

Rezultă că modificările biochimice cu un caracter ceva mai specific vor trebui căutate în primul interval după iradiere, cînd în funcție de intensitatea iradierii vor putea da un indiciu prognostic, urmărind apoi dinamica acestor modificări în concordanță și cu alte criterii.

În tabelul I sînt prezentate principalele modificări biochimice observate în urma iradierii acute, în primul interval de 24 ore.

TABELUL I

Unele modificări biochimice în urma iradierii acute, cu o doză letală

Clasă de substanțe	*Perturbarea observată*	*Specia*	*Bibliografie*
1	2	3	4
Acizi nucleici și metaboliți	Scăderea viscozității ADN extras	șobolan, șoarece	[31, 120, 132]
	Inhibarea sintezei ADN (limfocit)	șobolan, șoarece	[59, 69]
	Excreție crescută de dezoxicitidină	șobolan, șoarece	[107, 53]
	Excreție crescută de timidină, uridină	șobolan, om	[53, 40]
	Excreție crescută de acid aminoizobutiric	șobolan, om	[53]
	Eliberare DN-ază și RN-ază	șobolan, șoarece	[30,50]
Nucleotizi piridinici	Scăderea ATP în diferite organe	șobolan, șoarece	[22, 108]
	Scăderea NAD, NADP în diferite organe	șobolan, șoarece	[1, 128]
	Excreție crescută de metaboliți	șobolan, cîine	[53, 5, 128]

TABELUL I *(continuare)*

1	2	3	4
Proteine și aminoacizi	Degradare crescută datorită eliberării unor enzime proteolitice	șobolan, șoarece	[5, 80, 128]
	Scăderea biosintezei proteice	șobolan, șoarece	[128]
	Excreție crescută de aminoacizi	șobolan, om	[52, 85]
	Excreție crescută de creatină	șobolan, om	[63, 84]
	Excreție crescută de taurină	șobolan, om	[21, 78, 101]
	Creștere lipo- și glicoproteine	șobolan, om	[53, 5]
Glucide	Creșterea glicogenului hepatic	șobolan	[74, 105, 128]
	Hiperglicemie	șobolan, porc, om,	[105, 61, 75]
	Variații ale glicolizei	șobolan	[79, 128, 142]
	Variații ale raportului lactat/piruvat	șobolan	[103, 143]
	Scăderea șuntului pentozofosfat	șobolan	[124, 137]
Triptofan	Excreție crescută de cataboliți	șobolan, cîine	[128]
	Perturbări ale piridinnucleotizilor	șobolan	[128, 129]
	Variații ale metabolismului serotoninei	șobolan	[128]

Se pot observa, în concordanță cu cele menționate mai sus, atît variațiile de specie și organ, cît și diversitatea modificărilor. Dacă la aceste date (mult sumarizate) se adaugă modificările observate și în alte metabolisme (lipidic, hidromineral) sau în activitatea unor enzime (transaminaze, amilază), devine evidentă marea dificultate de a deosebi modificările primare de cele secundare. Iradierea unor organisme superioare este în primul rînd un stress, în urma căruia animalul respectiv va reacționa parțial nespecific (ca și în arsuri, electroșoc) prin eliberarea catecolaminelor, hiperglicemie, creșterea 17-cetosteroizilor [47, 66, 138].

Factorul hotărîtor în determinarea intensităţii efectelor radiaţiilor pare să fie constituit de capacitatea de refacere a leziunilor. Iar natura leziunilor biochimice provocate de iradiere, după ultimile păreri par să fie localizate nu la nivelul ADN, ci la cel al sistemului catalitic, regulator celular [8, 9, 49, 123]. Dealtfel, atît radiaţiile ionizante, cît şi radioprotectorii sau radiosensibilizatorii produc unele modificări comune asupra acizilor nucleici, mitozei, metabolismului glucidic etc.

Desigur, s-au emis multe ipoteze asupra mecanismelor implicate în modificările biochimice observate după iradiere, nefiind unanim admisă nici una. Pentru înţelegerea acţiunii radioprotectorilor sau radiosensibilizatorilor, vom prezenta pentru boala de iradiere o combinare originală a două ipoteze asupra mecanismelor modificărilor biochimice.

Formarea radicalilor liberi în urma iradierii soluţiilor apoase de diverse substanţe organice este unanim admisă [126]. Aceşti radicali liberi reprezintă o etapă intermediară de la absorbţia radiaţiei pînă la formarea produşilor de degradare stabili. Dacă radiaţia este de natura razelor X sau gama, se iniţiază un lanţ de reacţii începînd din momentul expunerii, prin pierderea energiei în mod continuu, dar în cantităţi mici răspîndite aleatoriu. De obicei energia este transferată unui electron prin interacţiune de tip Compton sau fotoelectric. Acest electron de mare energie traversează mediul, descărcîndu-şi intermitent energia, cu formare de molecule excitate sau atomi ionizaţi de-a lungul unei traiectorii a cărei lungime depinde de energia iniţială a electronului. În mai puţin de 10^{-9} s după această difuzie, apar mai multe specii de radicali foarte reactivi, a căror natură depinde de compoziţia chimică a moleculei atacate. Desigur, în medii biologice apare o mare varietate calitativă de radicali liberi. Moleculele organice vor produce mai ales atomi de hidrogen ($H^{\cdot}$), radicali organici ($R^{\cdot}$) şi electroni mobili (e_m^-). La aceştia se mai adaugă radicalii rezultaţi din radioliza apei: $H^{\cdot}$, hidroxil ($OH^{\cdot}$), H_2, electroni hidrataţi (e_{aq}^-) şi H_2O_2 [68]. În 10^{-6}s produsele radiolizei apei vor reacţiona cu diverşi compuşi organici, producînd o emisiune secundară de radicali liberi, în 10^{-2} s de la absorbţia iniţială. Randamentul radicalilor liberi primari este de aproximativ $6 \cdot 10^{-6}$ moli/1/1000 razi în soluţie diluată. Aceşti radicali liberi au fost evidenţiaţi prin rezonanţă electronică de spin (RES), puls radioliză [17, 27, 54].

Acizii nucleici, în special ADN, au fost intens studiați în acest sens și radicalii liberi au fost evidențiați în urma iradierii *in vitro* [20, 44, 97]. Principalele leziuni observate în ADN iradiat sînt ruperea legăturilor de hidrogen, a unui lanț și degradarea bazelor azotate. Dintre toți radicalii, hidroxilul liber (OH') pare a fi cel mai periculos [88, 97, 98]. Se admite că, cel puțin parțial, efectul mutagenic al radiațiilor se datorește unor astfel de deteriorări, nereparate de sistemele enzimatice celulare. Radicalii liberi au fost evidențiați și în celule [9, 19, 83, 109], unde suferă o mare varietate de reacții, în sensul formării unor noi radicali (lanț de reacții) sau inactivarea lor. Cea mai interesantă posibilitate este formarea peroxizilor organici, mult studiată [32, 34, 45]. În celule se găsesc atît factorii predispozanți ai peroxidării (ioni de Fe, hemoproteine în mică concentrație), substraturi adecvate (acizi grași nesaturați, steroizi, baze pirimidinice), dar și sistemele implicate în neutralizarea lor (hemoproteine în concentrație mare [100], glutation peroxidază [86, 106], antioxidanți de tipul vitaminei E, acid ascorbic, seleniu).

Formarea acestor peroxizi, ca urmare a producerii radicalilor liberi primari, depinde de balanța factorilor predispozanți și a celor inactivanți. Cei mai răspîndiți peroxizi sînt cei proveniți din acizii grași nesaturați de tipul acizilor linoleic, linolenic, arachidonic, care intră în compoziția fosfolipidelor, componente de bază ale membranelor celulare și subcelulare. Datorită caracterului lor puternic oxidant, a conținutului mare în energie liberă, hidroperoxizii au fost implicați în multe stări fiziologice, patologice (ateroscleroză, ciroză) [11, 32] sau în metabolizarea medicamentelor (cap. 2).

Critica cea mai serioasă a ipotezei radicalilor liberi și mai ales a peroxizilor este evidențierea lor neconvingătoare în țesuturi. Astfel, în timp ce Dubouloz [39], Horgan și Philpot [67] au găsit peroxizi în țesuturile animalelor iradiate, alți autori [55, 45] au infirmat aceste rezultate. Noi dovezi în favoarea existenței peroxizilor în țesuturi au fost aduse la Congresul II internațional de biofizică, Moscova, 1972, cînd acești compuși au fost evidențiați prin chemiluminiscență. Dealtfel o insuficientă metodă chimică de determinare a peroxizilor pare să fie una din cauzele majore ale controverselor existente.

Noi sugerăm că, dat fiind existența unor sisteme foarte eficiente de descompunere a peroxizilor, cît și a marii lor reac-

TABELUL II

Reacții și procese biochimice în care au fost evidențiați peroxizi

Tip de peroxizi	*Reacția*	*Organ*	*Autori*
H_2O_2	Formare în peroxizomi	Ficat, cloroplaste	[13, 32]
	Fagocitoză	Leucocite	[32, 116]
	Formarea tiroxinei	Tiroidă	[14, 32]
Peroxizi lipidici	Formare catalizată de lipoxidază	Cloroplaste	[127]
	Ramură adiacentă a sistemului transportor de electroni	Microsomi Mitocondrii	[32, 145]]73]
	Depolimerizarea ADN	Ficat, timus	[36]
	Inhibarea diviziunii celulare în urma acțiunii ultraviolete	*E. coli*	[48]
	Radiomimetici	Gonade	[149]
	Tulburări permeabilitate	Hematii, Lizozomi	[62, 55, 91]
	Inhibarea unor enzime, proteine		[32, 117]
	Oxidarea NADH și NADPH		[135]
	Inhibarea glicolizei	Hematii, ficat	[112, 105]
	Intoxicații cu alcool, CCl_4	Ficat	[90]
	Hemoglobinurie paroxistică	Hematii	[56]

tivități, acești compuși nici nu ar putea fi decelați în stare liberă în țesuturi. De exemplu H_2O_2, cel mai simplu peroxid ce se formează în mod curent în organism este dificil și destul de incert determinat datorită unor concentrații fiziologice între 10^{-11}—10^{-9} M [11, 45, 32]. În consecință, existența acestor peroxizi ar putea fi determinată doar indirect, prin efectele lor.

În acest sens, în boala de iradiere, ca și în alte stări fiziologice sau patologice, echilibrul dintre formarea și descompunerea peroxizilor poate fi deplasat temporar, în funcție de intensitatea iradierii. Perioada de timp în care sistemele de descompunere a peroxizilor sînt depășite poate fi foarte scurtă dar suficientă pentru producerea unor efecte. Recent Olinescu și Niță [106] au evidențiat modificări ale activității glutation peroxidazei (E.C.1.1.11.9) în hematii și țesuturi în urma iradierii cu debite diferite la aceeași doză letală de 700 razi. Cu cît debitul este mai mic, cu atît supraviețuirea este mai mare, cu atît apar mai puțini peroxizi pe unitatea de timp și suprafață, dînd posi-

bilitate enzimei să-i descompună. Activitatea glutation-peroxidazei este maximă la doze mici și scade la doze și debite mari [102]. Participarea acestei enzime (împreună cu alte sisteme) la procesul de refacere celular, de protecție naturală, ar explica, parțial, marea variație în funcție de specie, individ, organ, la iradiere, cît și rolul incert al glutationului în radioprotecție.

Rolul grupării sulfhidril (SH) ocupă un loc deosebit în radiobiologie, fiind implicat atît în boala de iradiere, cît și în explicarea acțiunii radioprotectorilor și radiosensibilizatorilor. Inițial, după lucrările lui Barron [12] asupra radiosensibilității crescute a unor enzime ce conțin gruparea SH, s-au atribuit acestei grupări un rol major atît ca „țintă" preferată a radiațiilor, cît și în radioprotecția naturală sau dobîndită (prin radioprotectori). Rezultatele lui Barron au fost mult criticate și ulterior s-a găsit că enzimele ce conțin gruparea SH nu au o radiosensibilitate mai mare decît a enzimelor ce nu o posedă [57, 118, 147). Totuși, în ultimii ani, gruparea SH a trezit interesul biochimiștilor datorită reactivității ei mari, care o face susceptibilă să participe în foarte multe reacții și să constitue baza unor mecanisme de reacții mult disputate. Astfel s-a dovedit că gruparea SH este mult implicată într-o serie de procese fundamentale ca fosforilarea oxidativă, biosinteza proteică, diviziunea celulară, activitatea catalitică și alosterică a multor enzime [106, 118, 119, 141]. Gruparea SH formează centrul catalitic sau regulator al multor enzime și cu atît mai mult poate fi o componentă importantă a sistemelor catalitice, implicate în procesele de refacere, de reparare a unor leziuni produse de iradiere [139, 150].

Logic, ar trebui ca în urma iradierii unor organisme, să se observe modificări ale parametrilor ce conțin gruparea SH. Dar, ca și în cazul radicalilor liberi și al peroxizilor, dovezile acumulate nu sînt suficient de convingătoare. Aceste argumente, experimentale și teoretice, sînt prezentate în tabelul III.

Compușii tiolici de tipul glutationului sau cisteinei sînt distruși de radiații cu un randament radiolitic mare chiar în absența oxigenului. În cazul grupărilor SH proteice, prezența proteinei micșorează mult efectul radiațiilor prin impedimente sterice și examinarea randamentelor radiolitice nu permite obținerea unor concluzii [118].

Revenind la ipoteza peroxizilor, menționăm în acest sens lucrările lui Little [86, 87] și O'Brien [100] sau Wills [144—146],

TABELUL III

Variația parametrilor ce conțin gruparea SH în urma iradierii *in vivo*

Parametrii	*Natura modificării*	*Organ*	*Bibliografie*
Glutation (SH neproteic)	Modificări discutabile; în general scăderi în primele ore, apoi creșteri	Diferite organe	[35, 6, 94] [103, 108]
GSH-peroxidază	Variații în primele ore	Hematie Ficat	[106]
Permeabilitate de membrană	Grupările SH componente scad	Hematie	[121, 131]
Radiorezistența naturală	Proporționalitate cu conținutul în grupări SH	Șoareci *M. radiodurans*	[130] [119]
Compuși tiolici	Inhibă formarea peroxizilor	Ficat	[86, 145]
	Valori de inactivare (*G*) foarte mari		[118]
	Radioprotectorii cei mai eficienți		

după care peroxizii au o foarte mare afinitate pentru gruparea SH, cu care reacționează preferențial, mai ales cu tioli ca GSH, cisteină. Dealtfel, formarea peroxizilor este inhibată de tioli, iar pentru ca aceștia să se formeze în țesuturi trebuie ca concentrația GSH să scadă foarte mult [28]. În consecință, scăderea în primele momente după iradiere a concentrației glutationului redus (GSH) [111] poate fi corelată cu variațiile glutation peroxidazei [106]. Rolul acestei enzime în radioprotecția naturală pare să fie asigurat prin prezența în structura ei a unei grupări SH și a patru atomi de seleniu (element antioxidant) [87, 106].

Vom mai reveni la ipoteza unui rol deosebit al grupării SH cu ocazia prezentării acțiunii radioprotectorilor și radiosensibilizatorilor.

7.2. Radioprotectori chimici

Substanțele cu acțiune radioprotectoare au aplicații restrînse, fiind folosite în radioterapeutică în unele cazuri de iradiere cu doze mari. Din cele cîteva mii de substanțe testate, doar cîteva au o aplicație experimentală și doar cistamina este comercia-

lizată (Bracco). Ca și în cazul bolii de iradiere s-a acumulat un vast material publicat, fără a se ajunge la un radioprotector perfect sau la acceptarea unui mecanism explicativ.

În fig. 7.1 sînt prezentați cei mai eficienți radioprotectori chimici, neabordînd protecția nespecifică (unele vaccinuri, toxine).

Chiar prin examinarea listei radioprotectorilor menționați se pune întrebarea, de ce nu toți compușii conținînd gruparea SH posedă capacitatea radioprotectoare?. Majoritatea tiolilor sînt inactivi (ergotioneina, acidul tioglicolic, coenzima A, ditiopro-

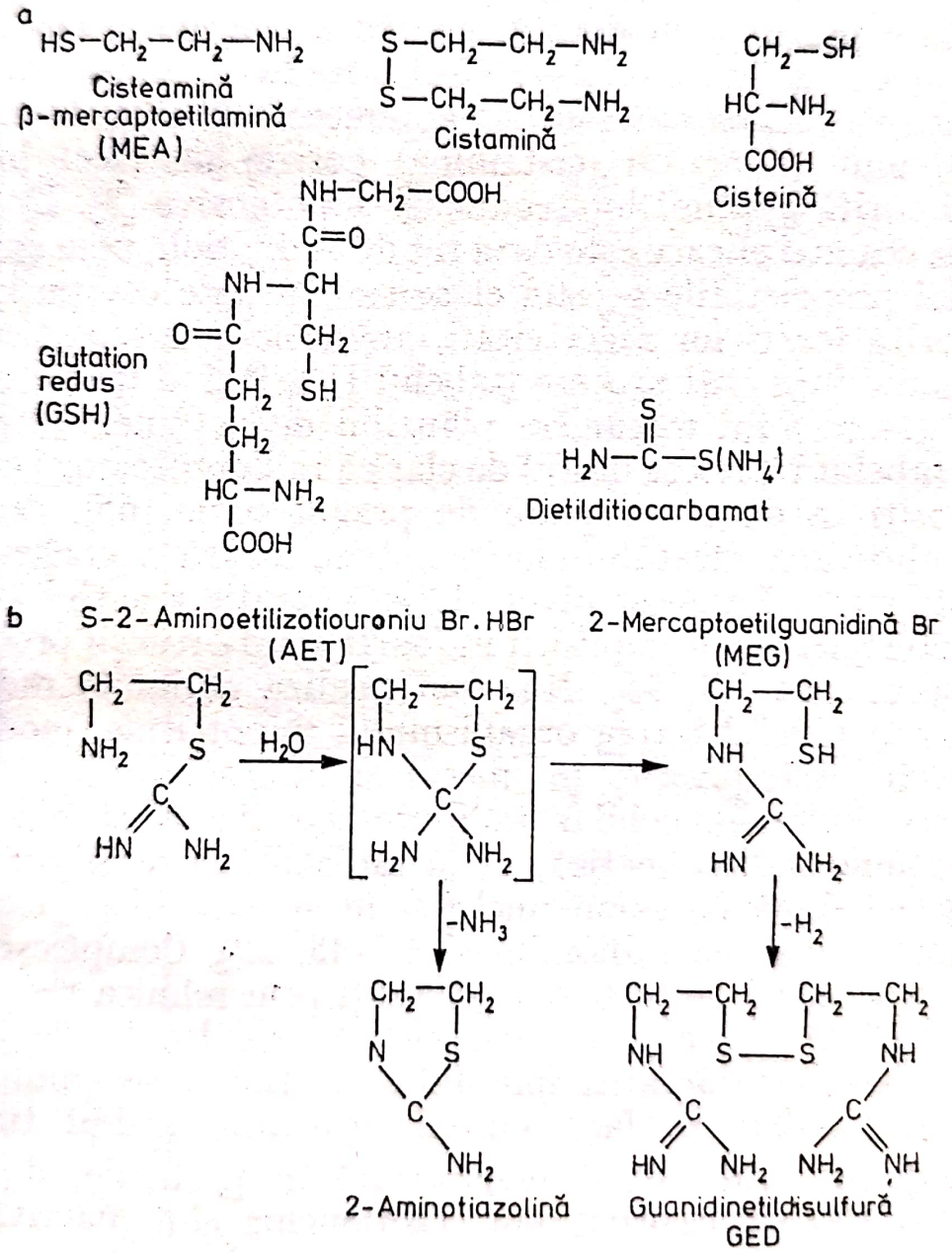


Fig. 7.1. Principalii radioprotectori chimici; (în partea de jos) transguanilarea AET în soluții apoase

panolul) sau activi doar pe bacterii (β-mercaptoetanolul), ori radiosensibilizatori ca tioglicolul, penicilamină. Răspunsul la întrebarea de mai sus este legat de existența unei structuri favorabile, fiind esențială prezența unei grupări SH și unei bazice (amină sau guanidină) separate cu cel mult trei atomi de carbon. Prezența grupării SH asigură deci aminotiolului o reactivitate mare.

Catecolaminele și histamina oferă o protecție moderată datorită hipoxiei produse și deci micșorării efectului oxigenului. Dealtfel unii agenți methemoglobinizanți (hipoxemianți) ca *p*-aminopropiofenona, azotitul de sodiu, anilina, oferă de asemenea o protecție moderată. Prezența oxigenului molecular, deși crește cu un factor de 2—3 efectul iradierii, nu este factorul predominant, deoarece aminotiolii acționează chiar în absența O_2. În plus, unii aminotioli (cistamina) posedă un efect hipoxemiant datorită acțiunii lor secundare hipotensive [8]. Deoarece protecția cea mai eficace este dată tot de aminotioli, vom examina în special proprietățile acestei clase restrînse de compuși.

Datorită marei lor reactivități, aminotiolii pot participa în foarte multe reacții și procese (tabelul IV), făcînd foarte dificilă sarcina găsirii unui mecanism plauzibil de acțiune.

Din tabelul IV reiese destul de clar că radioprotectorii chimici sînt folosiți în doze apropiate de pragul toxic [65], deoarece pentru obținerea efectului dorit trebuie atinsă o concentrație destul de mare. La acest nivel, desigur, grație reactivității lor, radioprotectorii vor fi implicați în foarte multe reacții producînd efecte secundare [46, 96]. Nu vom analiza acțiunile radioprotectorilor la nivelul întreg organismului (hipotermie, modificări circulatorii) neimplicate în mecanismul radioprotecției. La nivelul molecular sau celular, radioprotectorii posedă în general:

a) acțiune radiomimetică, ca și radiațiile și sensibilizatorii;

b) se combină cu acizii nucleici, în special ADN, explicîndu-se astfel acțiunea radiomimetică [148, 29]. Complecșii aminotiolilor cu ADN au fost mult studiați prin tehnica rezonanței (RES) [92]. O moleculă de cisteamină este legată de fiecare 3,3-nucleotizi, iar migrarea spinului către tiol în sistemul ADN-cisteamină iradiat se face numai prin intermediul timinei;

c) acțiune reducătoare, neimplicată în protecție, deoarece alți reducători ca ascorbat sau ergotioneina sînt inactivi;

d) efect anoxemiant, deja amintit. Aminotiolii protejează de asemenea contra toxicității oxigenului (condiții hiperbare,

TABELUL IV

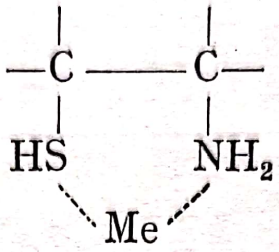
Efectele radioprotectorilor și dozele utilizate. Tabel efectuat după Bacq 8, cap. III-V.

Radioprotector	*Doză eficace* mg/kg	*Toxicitate DL* 50/30 mg/kg	*Reacții secundare radioprotecției*	
			la nivelul organismului	*la nivelul celular și molecular*
Cisteamină (MEA)	400—500 (o) 75—200 (i.p.)	600 (o) 280 (i.p)	Eliberarea catecolamine și histamină, scădere eosinofile, hiperglicemie, creștere colesterol, 17 cetosteroizi în sînge.	Leziuni mitocondriale reversibile, creștere raport lactat/piruvat, inhibiția timidinfosforilazei, modificări ale glicolizei.
Cistamină	400—600 (o) 150—300 (i.p)	1000 (o) 200 (i.p)	Antiinflamator, hipotensiv, efect adrenalitic.	Inhibă hexokinaza și consumul de oxigen, modificări ale glicolizei și a conținutului de acizi nucleici.
Cisteină	1900 (o) 350—1200 (i.p)	700 (o)	Pierdere în greutate, anorexie, epilare, scădere neutrofile.	Modificări ale glicolizei și proceselor de detoxifiere, inhibarea dezoxiribozil-transferazei.
AET	100 (i.p)	300 (i.p)	Modificări circulatorii și turburări gastrointestinale, sterilitate temporară.	Leziuni mitocondriale, scăderi ale succinat-dehidrogenazei, a GSH hepatic, a utilizării piruvatului, conținutului și sintezei ADN.
Dietilditiocarbamat	600 (i.p)		Efect antialcoolic	Inhibă hexokinaza.
Serotonină	95 (i.p)			
Histamină	220—350 (i.p)		Șoc, reacții alergice.	

Scanned with OKEN Scanner

atmosferă bogată în ozon). În acest ultim caz, mecanismul este clar prin inhibarea formării peroxizilor.

e) acțiune complexantă față de ioni metalici bivalenți, datorită participării simultane a celor două funcții active în formarea unui complex, schematizat alăturat. Diverse ipoteze asupra unui rol important al ionilor de Cu sau Fe în boala de iradiere nu au fost confirmate;



f) efect de captare a radicalilor liberi [121]. Acțiunea de captare a unor aminotioli *(scavenger)* a fost demonstrată pentru AET și cisteamină pe drojdia de bere iradiată [122].

Un radioprotector își exercită efectul numai dacă se găsește în celulă în momentul iradierii. Pentru o protecție maximă există un interval de timp între administrarea radioprotectorului și iradiere. Se admite deci că radioprotectorul este localizat în anumiți centri critici din celulă și că intervalul optim de timp reflectă un echilibru favorabil între legarea substanței, metabolizare și excreție [24, 89]. În decursul anilor s-a căutat să se demonstreze experimental existența unei corelații pozitive între concentrația tiolului tisulară și gradul de radioprotecție. Deși această corelație a fost găsită [81, 140], nu a satisfăcut mulți cercetători. Problema esențială a radioprotecției chimice constă în forma și repartiția radioprotectorilor în organism. Graficul din fig. 7.2, devenit clasic, continuă să pună în dilemă pe toți care încearcă să găsească un mecanism de acțiune al radioprotectorilor aminotiolici.

Acest grafic, verificat de mulți autori, indică existența a două maxime de radioprotecție la 10 și 45 minute de la administrare. Al doilea maxim al curbei de radioprotecție ar putea fi datorit eliberării de catecolamine, ce ar coincide cu instalarea hiperglicemiei și a unei hipoxii moderate [42]. Această ipoteză nu este însă unanim admisă.

Ipoteza *disulfurilor mixte* emisă de Eldjarn și Pihl [110] a devenit fundamentală pentru radioprotecție, cît și pentru multe mecanisme biochimice. Deși criticată, revizuită, această

ipoteză s-a menţinut, acumulîndu-se în decursul anilor suficient material experimental favorabil. Conform acestei ipoteze, în momentul iradierii, radioprotectorul se găseşte combinat cu proteine ce conţin grupări SH, formînd astfel disulfuri mixte,

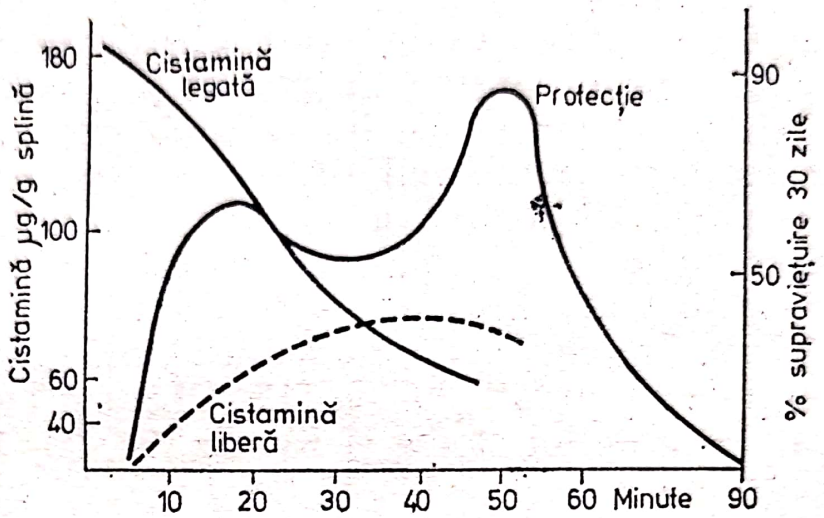


Fig. 7.2. Relaţia dintre concentraţiile cistaminei (libere şi legate) şi radioprotecţie. 100 mg/kg cistamină a fost administrată i.p. la şobolani, după care au fost iradiaţi cu 900 Rads [8, 18].

de forma P — SS — R (în care P = proteină, R = radioprotector), mai radiorezistente decît proteinele în stare redusă; această ultimă afirmaţie a fost dovedită experimental [118]. Astfel de reacţii de interschimb au devenit în ultimul timp obişnuite în biochimie.

$$R{-}SH + R'{-}SH \rightleftharpoons R{-}SS{-}R' \text{ şi } R{-}SS{-}R' + R{-}SH \rightleftharpoons R{-}SS{-}R + R'{-}SH;$$

sau, prin prezenţa proteinelor, vor apare reacţii de tipul următor:

$$P{-}SH + R{-}SH \rightleftharpoons P{-}SS{-}R \text{ şi } P{-}SS{-} + R{-}SH \rightleftharpoons P{-}SS{-}R + P{-}SH.$$

S-au obţinut disulfuri mixte între coenzima A şi GSH, hemoglobină şi GSH. În terapeutică, această proprietate a fost aplicată în cazul macroglobulinemiilor, cînd prin administrarea cisteaminei sau cisteinei se produce o depolimerizare a acestor agregate macroproteice, permiţînd sîngelui să-şi recapete fluiditatea [8 p78]. Cert este că în urma administrării intraperitoneale, în cîteva minute, totalitatea radioprotectorului se găseşte în formă de disulfură cu proteinele tisulare (fig. 7.2).

Principalele critici la adresa acestei ipoteze sînt predominanța caracterului reducător celular (valabilă în anumite limite) și faptul că momentul combinării maxime cu proteinele (cîteva minute) nu coincide cu cele două maxime ale radioprotecției (fig. 7.2). Recent Modig și col. [95] au demonstrat (confirmînd lucrările lui Calcutt [23]) că în urma administrării radioprotectorilor, după o primă creștere în țesuturi și formare de disulfuri mixte are loc o reacție de interschimb între aminotiolul liber și cel legat cu glutationul tisular, în sensul mobilizării acestuia din urmă. A fost confirmată lucrarea lui Jocelyn [77], cît și a lui Christophersen [28], după care glutationul este singurul tiol tisular existînd atît liber, cît și combinat ca disulfură cu proteine tisulare. Prezența acestor disulfuri GSH-proteine a mai fost decelată și de alți autori [70, 76, 115]. Ohara și Terasima [99] au confirmat lucrările lui Modig și Revesz [94, 95, 115] despre corelația dintre conținutul tisular în GSH și radiosensibilitatea unor tumori. Cercetătorii japonezi au observat că variațiile GSH din celulele HeLa urmează strîns schimbările în radiosensibilitatea ciclului mitotic, în care perioada S este mai radiosensibilă.

Eliberarea secundară de GSH tisular a fost prevăzută și de Bacq [8, 9], cît și de Graevsky [58, 60]. Acesta din urmă a arătat că în condiții de hipoxie se produce o creștere a GSH liber tisular. Legarea compușilor tiolici este încă puțin studiată din punct de vedere biochimic. Astfel, recent Olinescu și Mărgineanu [104] au observat în cazul proteinelor plasmatice o mare diferențiere între diferiți tioli. Legătura cea mai mare și mai durabilă a fost observată pentru tioli fără activitate radioprotectoare, ca 2-mercaptoetanolul sau acidul tioglicolic, în schimb aminotiolii radioprotectori posedă o reactivitate moderată. Dintre acești din urmă compuși, AET a prezentat cea mai mare reactivitate, iar cisteina pe cea mai mică, sugerînd o relație cu eficacitatea radioprotecției care scade în ordinea AET > glutation > cisteină. Legătura proteină-tiol din disulfura mixtă pare a fi totuși destul de puternică deoarece precipită odată cu proteinele sub acțiunea agenților denaturanți (acid tricloracetic).

Așa cum s-a mai menționat, datorită reactivității mari, gruparea SH este foarte sensibilă la acțiunea oxigenului atmosferic, sau în organism, la variații ale potențialului redox. Așa se explică creșterea SH neproteic observată în condiții de

hipoxie sau prin administrare de serotonină [125]. Oxidarea GSH din țesuturi a fost studiată în special în ficat [77, 104], găsindu-se dovezi experimentale pentru un mecanism în care oxidarea GSH este cuplată cu reacția catalizată de xantin-oxidază, cunoscută generatoare de superoxid (O_2^-) și H_2O_2. Tihonov [136] a prelungit efectul radioprotector al cisteinei prin asociere cu allopurinol, cunoscut inhibitor al xantin-oxidazei. Astfel, prin micșorarea oxidării GSH intratisular se poate obține o prelungire a efectului radioprotector.

Metabolizare. Ca și alte medicamente, radioprotectorii, în funcție de mai mulți factori, dar în special de concentrația lor, vor produce nu numai efectul dorit și vor interacționa cu mulți compuși. Datorită marii lor reactivități, radioprotectorii reacționează și cu gruparea carbonil a unor aldehide, producînd astfel multe reacții secundare observate, desigur parțial, în tabelul IV. Apariția unor compuși tiolici, diferiți de GSH în urma administrării aminotiolilor [58] este legată de posibilitatea unor reacții secundare. Astfel, în urma unei doze mari de glutation apare în sînge γ-glutamilcisteină, produs de hidroliză al GSH [10].

Metabolizarea aminotiolilor a fost cunoscută, în linii mari, grație folosirii S^{35}. Astfel, cisteina, un aminoacid esențial, este oxidat în acid cisteinsulfinic și degradat ulterior în sulfat, alanină și mai ales taurină. Cistamina și cisteamina dispar rapid din sînge (30—45 minute) și apar sub formă oxidată în urină (1/5 din doză). În urină mai apar sulfat și taurină. În ciuda rapidei reduceri în organism a cistaminei sînt destule dovezi pentru unele acțiuni specifice (tabel IV). În urma administrării AET se obțin în urină mai mulți metaboliți ca MEG, GED, taurociamină, acid guanidoetansulfonic, *S*-2-acetilmercaptoetilguanidină [121]. Acești metaboliți sugerează că aminotiolii nu se metabolizează pe o singură cale metabolică. Olinescu și Mureșan [101] au arătat că atît aminotiolii, cît și serotonina produc o creștere a eliminării taurinei și creatinei, efect similar cu cel produs prin iradiere. Un efect asemănător a fost găsit și asupra coenzimelor NAD și NADP [23, 105].

Bazat pe această metabolizare diferită, care afectează multe metabolisme intermediare, Bacq [8] a presupus că radioprotectorul produce un „șoc biochimic", în urma căruia organismul reacționează nespecific (menționat mai sus) și care ar pregăti organismul, astfel ca în momentul iradierii majoritatea sisteme-

lor de „alarmă, de protecție" să fie în stare activă. Această ipoteză nu a fost însă acceptată, printre altele și datorită insuficientei cunoașteri a acestor sisteme de protecție nespecifice. Șocul prin iradiere posedă numai unele trăsături comune altor tipuri de șoc (arsuri, electroșoc etc.).

Aminotiolii cu proprietăți radioprotectoare ar putea să-și găsească și alte utilizări în terapie. Se cunoaște cazul BAL (2, 3-ditiopropanol folosit de R. Peters ca antidot al lewisitei. Majoritatea aminotiolilor protejează organismele contra multor toxice ca tetraclorură de carbon, sau contra efectelor secundare ale agenților alchilanți radiomimetici folosiți în chimioterapia cancerului, ca Merophan, Myleran.

7.3. Radiosensibilizatori

În cele menționate mai sus a reieșit că există un paralelism între acțiunea radiațiilor ionizate și cea a mutagenilor chimici. În ciuda numeroaselor dispute se pare că totuși și în cazul mutagenilor chimici, sensibilitatea unor țesuturi depinde de conținutul în grupări SH libere, neproteice [2]. Un număr mai mare de grupări SH libere reflectă o capacitate metabolică mai mare, o biosinteză proteică accelerată [22, 82] indicată de un raport mai mare proteină/ADN.

Radiosensibilizatorii sînt substanțe chimice capabile de a face organismele sau unele sisteme biochimice mai sensibile la acțiunea radiațiilor ionizante. Ca și în cazul radioprotectorilor, cei mai eficace radiosensibilizatori sînt cei legați de gruparea sulfhidril. Astfel, substanțe blocante specific ale acestei grupări sînt maleimide *N*-substituite (în special *N*-maleimida), *p*-cloromercuribenzoat, iodoacetamidă.

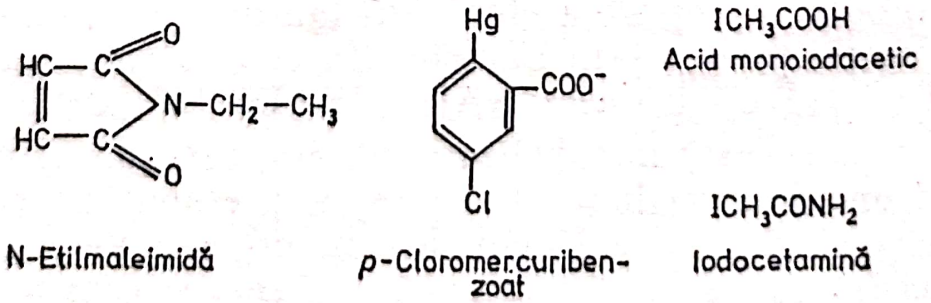


Fig. 7.3. Radiosensibilizatori cu acțiune blocantă asupra grupării SH

Deoarece multe tumori conţin mai ales celule în hipoxie, proporţia lor poate determina eficienţa radioterapiei. Efectul radiosensibilizator al oxigenului clar evidenţiat pe sisteme enzimatice sau culturi de ţesuturi a atras de mult atenţia. Dealtfel creşterea oxigenării tumorilor pe diferite căi fizice formează una din tendinţele radioterapiei moderne [41].

Cu excepţia 5-bromodeoxiuridinei şi a compuşilor similari, majoritatea experimentărilor s-au efectuat pe sisteme bacteriene sau rozătoare. Ideal, un radiosensibilizator ar trebui să nu fie toxic celulei normale, acţiunea sensibilizatoare să nu se exercite asupra celulelor bine oxigenate şi să reziste un timp metabolizării. În urma încercării unui mare număr de compuşi, doar cîţiva au fost selecţionaţi, îndeplinind criteriile de mai sus mai mult sau mai puţin.

Compuşii ce blochează gruparea SH au fost cel mai mult studiaţi. În cazul NEM studiile lui Adams [2] şi Sinclair [124] sugerează un mecanism prin producere de radicali liberi. Prezenţa acestui compus în momentul iradierii sensibilizează doar celulele anoxice. Pe lîngă afectarea metabolismului glucidic şi biosintezei proteice datorită blocării directe a grupărilor SH, NEM se combină în timpul iradierii cu ADN. Legarea se face prin intermediul radicalilor bazelor pirimidinice sau dezoxiribozei formaţi în urma producerii radicalilor liberi hidroxil $OH^{\cdot}$. Milvy [92] a observat un număr mai mare de radicali liberi prin RES în ADN iradiat în prezenţa NEM. După opinia acestui autor, NEM sensibilizează prin blocarea proceselor de reparare, atît la nivelul ADN, cît şi la nivelul moleculelor proteice. După cum sugerează Recondo [113] acest tip de radiosensibilizatori ar inhiba polimerazele ADN şi ARN.

În cazul iodoacetamidei prin metabolizare s-ar părea că rezultă o substanţă citotoxică. După Furnică [51] acest compus acţionează asupra biosintezei ADN în ţesuturi radiosensibile (splină, testicul), iar asupra organelor mai rezistente efectul ar avea loc la nivelul sintezei ARN. Cercetările biochimice, spre deosebire de cele fizico-chimice (RES), nu susţin lezarea ADN ca o cauză primară a efectului radiosensibilizator, fapt confirmat şi de Milvy [92]. Dewey [37] a arătat că în urma reacţiei iodoacetamidei cu radicalii $OH^{\cdot}$ produşi prin radioliza apei se pune în libertate iod atomic, cu mare capacitate oxida-

tivă. Oricum, acest tip de radiosensibilizatori acționează prin producere de radicali liberi, despre a căror acțiune am mai amintit. Trebuie menționat că toți acești radiosensibilizatori au o acțiune clară inhibitoare asupra glutation-peroxidazei [87], confirmînd încă odată posibila implicare a acestei enzime în radioprotecția naturală.

După ultimele lucrări [41, 51, 92, 97] în acest domeniu, acest tip de radiosensibilizatori își exercită o parte din efect asupra membranelor celulare și subcelulare, despre care am amintit că sînt sensibile la acțiunea radiațiilor. Radiosensibilizatorii, ca și radiațiile ionizante blochează grupările SH esențiale din componența membranei (în cazul hematiei acestea formează doar 10% din totalul grupărilor SH) [121, 131]. Se produc astfel alterări ale funcțiilor mitocondriale, ale ciclului umflare-contractare [38], avînd ca rezultat final modificarea permeabilității, a transportului diferitelor substanțe (mai ales apă și electroliți) și dereglarea echilibrului osmotic și reglării metabolice. Deci din nou întîlnim o similitudine cu radiațiile prin admiterea unei leziuni „specifice" la nivelul sistemului catalitic, regulator.

Implicarea proceselor enzimatice de reparare în efectul nociv al iradierii a fost încă odată confirmat prin acțiunea radiosensibilizatoare (cel puțin la bacterii) a unor inhibitori ai biosintezei proteice cum sînt actinomicina D și 2,4-dinitrofenolul.

Pirimidinele halogenate în care un atom de halogen (brom) este substituit hidrogenului din poziția 5 a uracilului sau citozinei au fost mult studiate. Din păcate acest tip de sensibilizatori nu diferențiază celulele anoxice de cele bine oxigenate. Substituția 5-bromouracilului în locul timinei din ADN produce sensibilizarea unor virusuri și celule. Mecanismul implică reacția bromuracilului cu e_{aq}^- producînd prin disociație un radical uracilil și ionul Br^-. Ulterior, radicalul uracilil devine uracil prin eliminarea unui H din altă moleculă (fig. 7.4). Prin propagarea unui lanț de reacții de acest tip se ajunge la o lezare a ribozei și desfacerea unei spirale din ADN.

Efectul sensibilizator al oxigenului a incitat la găsirea unor substanțe care să mimeze și să amplifice acest efect. Oxigenul este paramagnetic și oxidul nitric NO, gaz paramagnetic, are de asemenea un efect sensibilizator, dar din păcate prea toxic.

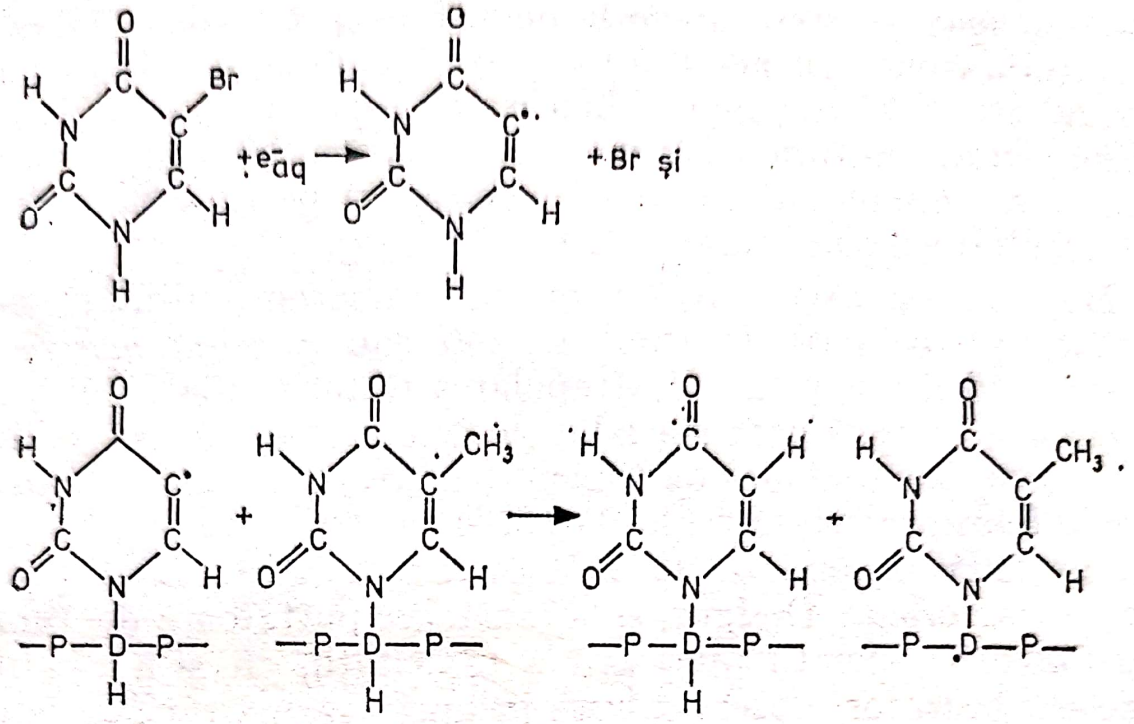


Fig. 7.4. Mecanism ipotetic al radiosensibilizării pirimidinelor

Mai activi s-au găsit o serie de nitroxili ca triacetoneamin-*N*-oxil (TAN) şi 2,2,6,6-tetrametilpiperidinol-*N*-oxil, care s-au dovedit activi pe bacterii [2,3].

Sensibilizatorii cu afinitate pentru electroni constituie o clasă cu substanţe active faţă de celulele de mamifere hipoxice. Lista este mare şi cuprinde compuşi cu structuri diferite ca cetone nitroaromatice, ceto derivaţi ai hidrindenului, chinone, unii esteri nesaturaţi, nitrofurani. Celulele în stare de hipoxie sînt semnificativ mai afectate. Diacetilii şi glioxalii au fost mai întîi studiaţi, dar concentraţia eficace se află în domeniul efectelor toxice [134]. În schimb chinonele, substanţe naturale, au prilejuit studii interesante, mai ales 2-metil-1,4-naftochinona (menadiona), care sensibilizează bacterii hipoxice la mici concentraţii. Mitchell [93] şi colaboratorii au observat un efect radiosensibilizator şi pe celule de mamifere. Rezultatele ulterioare nu au confirmat acest efect pe organisme mari. Recent s-a arătat că menadiona sau vitamina K_3 are numeroase acţiuni în organism (inhibă glicoliza, catalaza, methemoglobinemie) şi că efectul ei sensibilizator devine mai evident la concentraţii mari *in vivo* [103].

În general s-a observat că radiosensibilitatea este cu atît mai mare cu cît creşte afinitatea pentru electroni. Recent s-au

mai adăugat acestei categorii de compuși *p*-nitroacetofenona și nitrofurazone. În acest ultim caz Chapman și colaboratorii [25, 26] au arătat că prin combinarea cu ADN sînt afectate toate fazele ciclului mitotic, dar are loc și o permeabilizare a membranei. Experimentarea acestor compuși și pe rozătoare nu au dat rezultate încurajatoare [2, 64, 71, 114].

Majoritatea experimentărilor cu radiosensibilizatori s-au efectuat pe bacterii de tipul *E. coli* sau *Serratia marcesens*, cît și pe culturi de celule. Extrapolarea testării capacității sensibilizatoare pe rozătoare s-a izbit de cele mai multe ori de lipsa eficacității, dar mai ales de toxicitatea crescută a unor compuși. Dozele folosite variază de la 0,01 mM pentru menadionă, 0,1 la indanetrionă și pînă la 10 mM pentru dimetilfumarat pentru sisteme bacteriene. Desigur, și la rozătoare purtătoare de tumori s-au observat variații mari atît a toxicității, cît și a efectului radiosensibilizator, observîndu-se în unele cazuri randamente și ameliorări semnificative [2, 41, 51].

Așa cum în cazul radioprotectorilor sînt mai eficace amestecurile de radioprotectori cu structuri și acțiuni diferite, și pentru radiosensibilizatori sau radiații asocierea cu agenții chimioterapiei produce un efect mai semnificativ. Astfel s-au folosit vitamina K_3, actinomicina D, bleomicina, dar mai ales pirimidine halogenate ca 5-bromodeoxiuridină. Potențarea efectului radiațiile pe această cale ar reduce doza de iradiere eficace printr-un mecanism de sincronizare a celulelor în mitoză, astfel ca iradierea să se producă în anumită fază a ciclului mai sensibilă. Bleomicina omoară celulele aflate în mitoză și în faza postsintetică G_2, inhibînd diviziunea la granița fazelor S și G_1. Rezultatele clinice folosind bleomicina, hidroxiureea sau methotrexatul, substanțe ce par să aibă o acțiune similară, nu au dat rezultate concludente.

Încheiem acest capitol închinat unui domeniu mai restrîns ca posibilități farmacodinamice evidente în momentul de față, dar cu perspective pentru viitor. Deoarece substanțele cu acțiune farmacodinamică în acest domeniu nu sînt încă perfecte și mecanismele biochimice implicate pot să explice mai mult sau mai puțin efectele observate. Modificările metabolismelor acizilor nucleici și al grupării SH par să fie un numitor comun atît în boala de iradiere, cît și în cele două aspecte farmacodinamice opuse: radioprotecție și radiosensibilizare.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 8

FARMACOGENETICA

8.1. Introducere

Cu ocazia studierii metabolizării medicamentelor în general (cap. 2) a fost menționată de mai multe ori posibilitatea modificării răspunsului organismului la administrarea unui medicament de o serie de factori legați de specie sau individ. Farmacogenetica ar însemna studiul consecințelor clinic semnificative ale diferențelor ereditare în urma administrării medicamentelor [89]. Această ramură a farmacologiei s-a dezvoltat în ultimii 15 ani ca urmare a acumulării unui bogat material factic.

Amploarea problemei unor reacții secundare, neprevăzute în urma administrării medicamentelor, este indicată de faptul că 5% din totalul spitalizărilor se produc din această cauză, iar în timpul spitalizării, aproape 15% din pacienți manifestă în grade diferite astfel de reacții [96].

Farmacogenetica a făcut obiectul unor numeroase congrese și simpozioane, cu care ocazie s-au diferențiat aspectele clinice, farmacologice, genetice și biochimice. În acest capitol vom insista pe aspectul biochimic, în deficitul congenital al unor compuși, de obicei enzime.

În capitolul 2 s-a menționat existența unor mari variații individuale în vitezele metabolizării medicamentelor folosite în mod curent. Consecințele clinice ale acestor variații individuale pot lua forma unei toxicități în cazul unei metabolizări încete sau a ineficienței terapeutice pentru o metabolizare prea rapidă. S-a ajuns astfel la concluzia că o doză „normală" pentru unii pacienți poate fi toxică sau ineficace pentru alții, aceasta fiind valabilă și pentru alimentație.

Inducerea sistemului hidroxilant microzomial în urma administrării unor medicamente, compuși chimici, toxine, poluanți etc., furnizează cele mai multe surprize prin larga variație indi-

Scanned with OKEN Scanner

vidual. Rezistența ereditară a virusurilor, bacteriilor și a altor organisme inferioare la medicamente se datorește transferării materialului genetic modificat noilor generații. La animalele de laborator, șoareci și șobolani, s-au descris numeroase diferențieri în sensul existenței mai ales a unor suișe cu largi variații în metabolizarea unor medicamente, sensibilitate la alcool etc. Binecunoscuta rezistență a alcoolicilor la anestezice se datorește doar parțial rezistenței dobîndite, în rest se pare că implică și un factor ereditar [23]. Lipsa congenitală a sensibilității la culori pare a fi corelabilă cu ciroza hepatică și chiar dacă constituie un factor minor în alcoolism, crește riscul unei predispoziții [17].

În majoritatea cazurilor, eroarea congenitală se comportă ca un singur factor rezultat dintr-o mutație transmisă în tip clasic mendelian. S-au putut decela în unele cazuri în aceste loci alele mutante multiple. Unele erori sînt extrem de rare, cum ar fi sensibilitatea la bishidroxicumarină, parahidroxilare deficitară a difenilhidantoinei, rezistență la warfarină, care au fost semnalate doar la 1—2 familii. În schimb deficiențele congenitale în glucozo-6-fosfat-dehidrogenază sau în inactivarea izoniazidului sînt destul de frecvente și în unele grupuri de populații, frecvența genei cu alele aberante poate fi mult semnificativă [96].

Desigur, cu cît studiile genetice efectuate pe mase largi de oameni vor fi mai extinse, atît cantitativ, cît și calitativ, se vor putea obține informații prețioase. Oricum, de pe acum se recomandă abandonarea administrării medicamentelor pe baza greutății corporale și individualizarea dozelor bazate pe determinarea concentrațiilor medicamentelor în sînge. Deși concentrația unui medicament, eficacitatea sa terapeutică și toxicitatea pot reprezenta trei trăsături genetice independente, totuși pentru multe medicamente s-a demonstrat o corelație directă între concentrația sanguină și toxicitate [94]. Studii efectuate pe gemeni au confirmat marea variabilitate individuală în privința răspunsului la o substanță inductoare cum ar fi fenobarbitalul și că la oameni sănătoși această variabilitate este sub control genetic rigid [95]. Participarea relativă a factorilor genetici și de mediu în larga variație individuală rămîne încă deschisă cercetătorilor.

Scanned with OKEN Scanner

8.2. Deficit congenital enzimatic

În această grupă intră un mare număr de erori congenitale la nivelul unei enzime, din care unele trec neobservate (exemplu acatalazemia), iar altele au un deznodămînt fatal (lipidoze). Între aceste extreme s-a semnalat un foarte mare număr de erori congenitale, care diferă prin natura enzimei deficitare, gradul acestei erori în sens cantitativ sau calitativ (mai ales în polimorfismul acestora). Harris [31] a demonstrat posibilitatea controlului genetic al variației enzimelor prin utilizarea unor teste rapide orientative susceptibile a fi aplicate la mase largi. Profilul „enzimatic" al unui individ poate să-l caracterizeze în aceeași măsură ca și amprentele sau grupele sanguine.

8.2.1. *Variante genetice ale acetilării medicamentelor*

După cum s-a arătat în capitolul 2, multe medicamente importante din clasa aminelor aromatice sau hidrazinelor sînt metabolizate pe calea *N*-acetilării, ca de exemplu izoniazid (1-izonicotinilhidrazină), sulfametazină, fenelzină, sulfadiazină etc. Izoniazidul apare în urină în formă acetilată în proporție 14—70%. Studiile lui Biehl [9] confirmate și de alți cercetători au arătat existența a două mari grupuri: inactivatori rapizi și înceți, care acetilează izoniazidul cu viteze mult diferite. Astfel timpul de semiviață variază de la 30—80 minute pentru cei rapizi, pînă la 140—300 minute la cei înceți [57]. Izoniazidul este acetilat de *N*-acetil-transferaza din ficat după un mecanism de tip ping-pong Bi-bi, într-o reacție cu două etape ce implică formarea și descompunerea unui derivat acetilat [44, 99]. În cazul ambelor fenotipuri, enzimele purificate au prezentat aceleași proprietăți calitative. Activitatea enzimei din ficat la un acetilator activ este cu un ordin de mărime mai mare decît la unul încet. Singura diferență calitativă observabilă între cele două fenotipuri a fost în migrarea electroforetică a enzimei purificate, sugerînd o variație în polimorfismul acetil-transferazei [57].

Un acetilator încet tinde să acumuleze izoniazid și alte medicamente care sînt acetilate înainte de a fi excretate. Astfel de reacții pot apare și la alte medicamente care sînt acetilate ca

fenelzina, hidralazina, sulfametazina, dapsona [21, 73]. Izoniazidul oferă un caz interesant de interacțiune cu difenilhidantoina, legat de polimorfismul acetil-transferazei. Astfel s-a observat că izoniazidul inhibă metabolizarea difenilhidantoinei cu apariția unor efecte toxice. Aceste incidente apar numai la cei mai înceți acetilanți [40, 56]. Dealtfel, izoniazidul acționează ca un inhibitor competitiv al metabolizării difenilhidantoinei de către sistemul hidroxilant microzomial [56]. De menționat este faptul că diferențele genetice în metabolizarea izoniazidului nu au o mare importanță în tratamentul tuberculozei [57].

8.2.2. *Polimorfismul pseudocolin-esterazei*

Colinesteraza serică la om este supusă unor numeroase variații în structură și activitate. Aceste diferențe calitative și cantitative observate reprezintă forme polimorfe distincte ale enzimei și alterări genetice ale mecanismelor de control ale sintezei și degradării proteinei. Variantele pseudocolin-esterazei prezintă o importanță clinică pentru unii pacienți tratați cu succinilcolină, un relaxant muscular. S-au identificat doi loci genetici ca determinanți ai activității enzimei. Un locus, denumit E_1, pare a fi cel mai important, conținînd 4 gene alele (normal, atipical, fluorură, silent) și determină polimorfismul genetic [57]. După cum au arătat Goedde și colaboratorii [25], între două fenotipuri umane, enzima din ser prezintă diferențe marcate cinetice față de succinilmono sau dicolină ca substrat. Aceste diferențe se reflectă într-o serie de proprietăți ca *p*H optim, constanta Michaelis, K_i etc. Enzima din ser prezintă patru benzi distincte electroforetice, mase moleculare diferite, dar același centru activ [46, 57]. Oricum, se admite că două treimi din persoanele ce prezintă apnee prelungită după injectarea succinildicolinei posedă pseudocolin-esteraze atipice.

Trebuie menționat că persoanele ce nu posedă activitate colinesterazică în ser sau în hematie sînt aparent sănătoși și au numai dezavantaje farmacologice [84].

8.2.3. *Deficit în glucozo-6-fosfat-dehidrogenază*

Distrugerea globulelor roșii produsă prin infecții sau prin administrarea unor alimente sau medicamente este cunoscută de mult timp. Dealtfel hematia, deși are un metabolism redus față de alte celule, prezintă o gamă largă în deficite congenitale locali-

zate la nivelul unor enzime aparținînd de obicei glicolizei sau legate de glutation. După cum arată unii autori [7, 64], persoanele ce prezintă astfel de deficite se comportă aparent sănătoși, neprezentînd anemii spontane. Deficitul în glucozo-6-fosfatdehidrogenază (G-6-PD) în schimb este foarte comun, afectînd milioane de oameni [8]. Această enzimă este specificată de o genă structurală pe cromozomul X. Numărul total al variantelor cunoscute pare să depășească 100 și pot fi diferențiate electroforetic și enzimologic prin măsurarea afinității față de substrat, *p*H optim, constante cinetice [53, 103].

Multe variante ale G-6-PD sînt asociate cu o reducere mică sau chiar deloc a activității enzimatice, așa încît purtătorii lor nu sînt sensibili la acțiunea unor medicamente sau alți agenți. După Yoshida [103, 104] variantele cu deficite enzimatice pot fi împărțite într-o primă clasă asociată cu anemie cronică și în alta, în care hemoliza este provocată de administrarea unor medicamente sau alți agenți. În fiecare clasă există, desigur, forme severe și blînde. După cum se observă din lista medicamentelor din tabelul I, nu există o legătură structurală între ele, cu excepția caracterului oxidant predominant. Mecanismul exact al producerii hemolizei nu se cunoaște, dar pare să implice glutationul redus. După toate probabilitățile, aceste medicamente produc prin metabolizare H_2O_2, care în mod obișnuit este descompus de catalază și glutation-peroxidază [15, 69]. Aceste enzime necesită glutation redus, care nu poate fi reîmprospătat decît prin șuntul pentozofosfat în care G-6-PD are un rol cheie [41, 102].

TABELUL I

Medicamente uzuale ce produc hemoliză în deficit congenital de G-6-PD

Primachin, Pamachin (antimalarice) 30 mg;	Acetanilidă 3,6 g
Acetofenetidin (Fenacetin)	Fenilidrazină 30 mg
Sulfanilamidă	Trinitrotoluen
Salicilazolsulfapiridină (Azulfidin) 7 g	Quinidină 0,8 g
Nitrofurantoină (Furadantin) și alte nitrofurantoine	
Sulfisoxazol (Gantrisin) 400 mg	Neosalvarsan 600 mg
Diaminodifenilsulfonă, Tiazosulfonă	
Cloramfenicol, Acid paraaminosalicilic	
Neoarsfenamină, Fenilsemicarbazidă (Criogenină)	

Existenţa unor insuficienţe hepatice sau renale pot complica mult tabloul clinic, transformînd un medicament de mică toxicitate într-un agent hemolitic puternic. Acidoza diabetică, perturbările în metabolismul hidroelectrolitic pot altera şi mai mult sensibilitatea. Infecţii, mai ales hepatite, pneumonii, produc hemoliză, iar în febra tifoidă tratată cu cloramfenicol pare să fie un sinergism între maladie şi medicament [62]. Fasolea de tip *Fava* produce o hemoliză cunoscută încă din antichitate, cu forme chiar fatale. Favismul apare mai ales la copii de sex masculin, fiind destul de frecvent în China şi bazinul mediteranean. Pe lîngă acest tip de fasole, hemoliza poate fi provocată de pere şi unele ciuperci [51].

După cum arată Yoshida [102], gradul deficitului în G-6-PD nu este proporţional cu severitatea clinică a bolii, fapt dealtfel remarcat şi în alte anomalităţi genetice enzimatice. De asemenea, nici diferenţele în proprietăţile cinetice ale enzimei cu atît de multe variante nu pot explica manifestările hemolitice. Ţinînd seama de concentraţiile fiziologice în ATP, NADPH, Yoshida a arătat printr-o analiză cinetică posibilitatea inhibării enzimei de către aceşti nucleotizi, în variantele genetice studiate [104]. Oricum, metaboliţii medicamentelor citate în tabelul I cresc fragilitatea mecanică a hematiei prin mecanisme ce includ efecte asupra membranei şi alterări în conţinutul intracelular de glutation, NADPH şi methemoglobină [23]. Deficitul în G-6-PD nu permite deci reducerea glutationului şi nici refacerea pe cale metabolică a perturbărilor produse de metaboliţii acestor medicamente.

8.2.4. *Hemoglobine anormale*

Deşi nu este o enzimă, hemoglobina este constituentul principal al hematiei, fiind implicată în deficitul unor enzime, aşa cum s-a arătat în cazul G-6-PD. Hemoglobina reprezintă proteina cea mai bine cunoscută, atît din punct de vedere biochimic, cît şi genetic. Sinteza hemoglobinei se află sub controlul principal a două gene nelegate; una implicată în codificarea lanţului alfa, iar cealaltă pentru lanţul beta. Molecula funcţională de hemoglobină este un tetramer compus din două lanţuri alfa şi două beta, fiecare fiind legat de gruparea hem. Cercetările iniţiate de Perutz şi colaboratorii [72] au permis cunoaşterea

secvenței aminoacizilor din lanțurile polipeptidice și construirea modelelor tridimensionale.

Majoritatea variantelor hemoglobinei diferă de molecula normală doar prin substituirea unui aminoacid. Înțelegerea codului genetic a arătat că toate substituțiile mutaționale ale aminoacizilor din molecula de hemoglobină pot fi explicate prin schimbări într-o singură pereche de baze a codonilor din acidul dezoxiribonucleic [3]. Deși teoretic toți cei 141 aminoacizi ai hemoglobinei pot suferi substituiri, ulterior s-a găsit că numai 9 ocupă aceleași poziții în mai multe hemoproteine, înlocuirile majorității aminoacizilor permit funcționarea normală a moleculei. Pot fi deosebite mai multe clase de modificări mutaționale. Astfel, mai mult de jumătate din mutațiile observate sînt datorite unor substituții de aminoacizi cu încărcătură similară, deci nedetectabile electroforetic. Acest tip de mutații cuprinde mai mult de jumătate din alterările moleculei de hemoglobină și trec neobservate deoarece electroforeza rămîne metoda cea mai răspîndită de investigație în masă.

Așa-numitele hemoglobine anormale, detectabile electroforetic, sînt datorate unor modificări în sarcina electrică, dar care nu se repercutează în alterări ale funcționalității moleculei din cauza poziției neesențiale unde a avut loc substituția aminoacidului (hemoglobine tip G-Copenhagen și J-Cambridge) [83]. Din punct de vedere farmacogenetic sînt interesante mutațiile ce produc instabilitate moleculară și alterări funcționale, în care intră mai multe tipuri de hemoglobină cu modificări produse prin mecanisme diferite. Cel mai cunoscut și mai răspîndit tip este hemoglobina tip S (Hb S) datorită substituției acidului glutamic din poziția a șasea *N*-terminală a lanțului beta cu valină. În timpul hipoxiei au loc modificări conformaționale care produc la purtătorii acestui tip de hemoglobină alterarea membranei hematiei într-o formă caracteristică de seceră. După Murayama [65] acest fenomen se datorește formării unei legături hidrofobe între *N*-terminal al unui reziduu normal valină și valina introdusă mutațional. Legătura valil-valil pare să perturbe întreaga conformație a moleculei propagîndu-se la cele învecinate. Moleculele Hb S se vor orienta liniar, gen cap-coadă monofilament, cu axele longitudinale perpendiculare pe liniile magnetice de forță.

Hipoxia poate apare înainte, în timpul și după anestezie. Administrarea înaintea anesteziei a unor medicamente cum ar

fi atropina produce o hipoxemie semnificativă [92], care va crește în cursul actului operator. În acest sens la toți pacienții avînd hemoglobina S este obligatoriu administrarea oxigenului, indiferent de durata operației sau tehnica anesteziei utilizate. Hematiile ce conțin hemoglobina S produc oricum o creștere a viscozității sîngelui, o curgere mai înceată în capilare și deci o hipoxie. Se formează un cerc vicios, care în cazul anesteziei generale poate provoca infracte splenice sau pulmonare [39]. Folosirea diverșilor compuși chimici ca propan, fenotiazine sau steroizi nu a permis pînă în prezent corectarea acestui deficit genetic.

O altă categorie, mai largă, este formată din hemoglobinele nestabile, foarte des asociate cu anemie hemolitică [38]. Din datele încă incomplete (numărul lor crește în fiecare an) prezentate în tabelul II rezultă că mutațiile implică substituiri ale aminoacizilor în poziții cu importanță structurală. Astfel rezidii de aminoacizi nepolari care formează legături hidro-

TABELUL II

Hemoglobine instabile, date structurale și proprietăți

Nume	*Lanț implicat*	*Rezidiu*	*Substituirea*	*Poziția**	*Procent A_1*	*Procent A_2*
Hb Zürich	β	63	Histidină → Arginină	E 7	20—36	2,5—5
Hb Köln	β	98	Valină → Metionină	FG 5	10—15	normal
Hb Seattle	β	70	Alanină → Ac. Glutation	E144	43	2,5
Hb Sydney	β	67	Valină → Alanină	E111	30	
Hb Genova	β	28	Leucină → Prolină	B10	25	normal
Hb Tacoma	β	30	Arginină → Serină	B12	43	3,5
Hb Hammersmith	β	42	Fenala → Serină	CD1	30	3,2
Hb Sinai	β	47	Ac. Aspartic → Histidină	CD5	27—32	2,5—3,0
Hb Freiburg	β	23	Valină → 0	B5	27—32	2,5—3,0
Hb Gun Hill	β	93—97	(Cist-Asp-Lis-Leu-Hist) → 0	F9—FG4	20	

* Poziția se referă la modelul lui Perutz [72]. Întocmit după Motulski [64].

fobe cu ciclul porfirinic sînt înlocuite în hemoglobinele tip Köln și Sydney cu alte rezidii nepolare dar de dimensiuni diferite [13]. În cazul Hb Köln, metionina din poziția 98 β poate deplasa histidina din poziția învecinată 97, producînd modificări în sarcina electrică. Substituirile prezentate în tabelul II produc adesea legături tip van der Waals cu hemul (Hb Köln, Hammersmith, Sydney).

Substituirile mutaționale din aceste hemoglobine și modificările conformaționale ale proprietăților ce determină instabilitatea lor se recunosc prin precipitarea lor în hematie și colorarea specială sub forma corpusculilor Heinz alcătuiți din globine denaturate. Strîns legată de această proprietate este și acumularea methemoglobinei în hematii cu hemoglobine anormale în urma incubării prelungite. În sîngele proaspăt recoltat, methemoglobina crescută se găsește doar în cazul Hb Freiburg [45], ce conține o variantă a Hb M asociată cu anemie hemolitică.

Hemoglobinele anormale au o tendință crescută spre oxidare, formarea methemoglobinei trebuie considerată ca accelerarea oxidării normale a Fe heminic. Substituțiile în anumite regiuni critice, cum ar fi E7 histidină distală, F8 histidină proximală și E11 creează un mediu favorabil și sînt asociate cu methemoglobinemie cronică și cianoză [32, 64].

Hematiile ce conțin hemoglobine anormale sînt deosebit de sensibile la medicamente care prin metabolizare eliberează H_2O_2 ca produs secundar al reacțiilor de oxidoreducere [15, 16]. Astfel de medicamente sînt destul de numeroase, cu structuri variate și cităm sulfonamide, sulfisomidină, sulfisoxazol, sulfamerazină, sulfadimetoxină, compuși ai oxichinoleinei (primachin). Mecanismul formării methemoglobinei implică epuizarea sistemului natural de protejare al hematiei ce cuprinde glutationul redus-glutation-peroxidază [69] probabil datorită caracterului labil al hemoglobinei.

Thalasemia se caracterizează de asemenea prin prezența a două tipuri de hemoglobine anormale, instabile, dar datorită structurii cuaternare alterate. Hb α reprezintă un surplus de lanț α, secundar unui deficit sever în lanțul β. Hb H (Hb β_4) reprezintă un surplus de lanț β secundar unei deficiențe în lanț α [67]. După cum au arătat Benesch [4] și Huhens [39], aceste hemoglobine au proprietăți diferite de tipul normal și nu funcționează ca pigmenți respiratori ai sîngelui. Și în acest caz, administrarea unor medicamente de tipul sulfonamidelor pot da accidente.

Scanned with OKEN Scanner

S-a mai comunicat formarea crescută de methemoglobină și de corpusculi Heinz în sîngele periferic în urma administrării la unii pacienți de acetofenetidină (30 mg/kg). Acest medicament larg folosit ca analgesic și antipiretic mai produce în aceste cazuri și insuficiență renală. Nu se cunoaște mecanismul acestei comportări, în care nu pare să fie implicat nici un deficit în glucozo-6-fosfat-dehidrogenază și nici anomalii ale moleculei de hemoglobină, mai de grabă pare să fie datorit unui deficit în metabolizarea acestui medicament [82].

8.2.5. *Methemoglobinemie ereditară*

Formarea methemoglobinei *in vivo* poate să se producă prin mai multe mecanisme, declanșată sau nedeclanșată de unele medicamente. Datorită marii importanțe pentru organism, sistemele de apărare ale hemoglobinei față de peroxizii produși prin metabolizarea medicamentelor sînt de mai multe feluri și localizate pe anumite etape ale producerii de H_2O_2 (catalază, GSH-GSH-peroxidază) sau ale reducerii methemoglobinei neoformate.

Methemoglobina, în care fierul heminic este în formă trivalentă, nu este capabilă de a lega reversibil oxigenul molecular. Normal, în hematiile umane conținutul de methemoglobină este de aproximativ 1%, datorită eficienței sistemelor methemoglobin-reducătoare. După Scott [81] sistemul cel mai eficace este reprezentat de NADH-methemoglobin-reductaza (61%), urmat de glutation redus (12%), NADH-dehidrogenaza $_{II}$ (6%) și NADPH-methemoglobin-reductaza (5%). Aceste cifre indică importanța sistemului NADH-methemoglobin-reductazic, dar și posibilitatea creșterii ponderei celorlalte sisteme în cazul unui deficit al căii principale.

Într-adevăr s-au descris cazuri de deficit sever congenital în NADH-methemoglobin-reductază [14, 42]. Acest deficit, transmis autozomal, apare și la homozigoți și la heterozigoți, iar procentul de methemoglobinemie este foarte variabil din cauza intervenției celorlalte sisteme. În toate cazurile însă există o sensibilitate la medicamentele care produc prin metabolizare H_2O_2, menționate în părțile precedente. Methemoglobinemia, ca alterare izolată nu pare să amenințe viața pacientului [43] sau timpul de viață al hematiei. Totuși, în cazuri de

deficit sever, pacienții prezintă o cianoză discretă asociată cu unele leziuni cardiace [42].

Această rezistență remarcabilă rezultă din marea suplețe a sistemelor reductazice. Dealtfel tratamentul principal în cazuri severe sau provocate prin administrarea unor medicamente constă tocmai în activarea sistemului NADPH-methemoglobin-reductazic cu ajutorul albastrului de metilen [11]. Deși această metodă este cunoscută de peste 50 ani, mecanismul este încă puțin cunoscut. *In vitro*, albastrul de metilen activează NADPH-methemoglobin-reductaza, dar poate reduce methemoglobina și neenzimatic [85]. Pe de altă parte, albastrul de metilen activează șuntul pentozofosfat furnizînd NADPH [12], iar pe de altă parte aceeași substanță poate forma methemoglobină [77], mai ales în prezența luminii [54]. Albastrul de metilen nu este singura substanță care poate acționa atît de paradoxal; vitamina K_3 de asemenea poate oxida hemoglobina în concentrații mari și în același timp reduce methemoglobina neoformată [29, 68].

Problema anemiilor induse de medicamente este foarte complexă și cu tot interesul practic și teoretic, cu tot efortul depus, nu s-a reușit obținerea unei soluții satisfăcătoare. Pe de o parte, deficitul congenital situat la nivelul unei proteine (hemoglobină sau enzimă) poate fi variat, în cele mai multe cazuri doar administrarea unui medicament atrage atenția asupra unei comportări mai deosebite. Pe de altă parte, organismul dispune de mai multe sisteme de protecție, suple, a căror pondere poate varia în limite foarte largi. Dar methemoglobinemia poate apare în urma administrării unor medicamente nu numai în cazul unui deficit genetic situat la nivelul unor proteine din hematie. S-au semnalat astfel apariția methemoglobinemiei, cianozei, corpusculilor Heinz în urma administrării anestezicului prilocaină (*N*-2-propilaminopropionil-2-toluidină) [33], 4,4′-diaminodifenilsulfonă (Dapson) folosit în tratamentul leprei și dermatitei, herpetiformis [34] sau intoxicații cu aminofenoli, fenilhidroxilamine, fenilendiamine [52]. Toți acești compuși sînt metabolizați de către sistemul hidroxilant microzomial. Totuși la unele persoane, un metabolit intermediar avînd gruparea nitrozo-aromatic declanșează apariția unei methemoglobinemii severe. Probabil în aceste cazuri există un deficit în șuntul pentozofosfat din ficat sau în sistemul de detoxifiere hepatic [34].

Scanned with OKEN Scanner

O altă categorie de boli produse de medicamente cuprinde anemiile aplastice provocate mai ales de cloramfenicol, atabrină difenilhidantoină, meprobramat, fenilbutazonă și chiar aspirină. Desigur că această anemie nu este legată de un deficit în sistemul methemoglobin reducător. Însă nu se știe de ce numai unii indivizi prezintă astfel de anemie [7], deoarece în unele cazuri s-au găsit intacte atît sistemele protectoare din hematie, cît și cele metabolizante din ficat [98]. De asemenea neexplicate sînt anemiile feriprive provocate la unii pacienți de corticosteroizi [90], pirimetamină [19], fenobarbital [35], izoniazid [63]. În această categorie, anemia poate rezulta fie din perturbarea producerii hematiilor sau dintr-o distrugere a lor, accelerată, indusă de medicament.

În încheierea acestei părți dedicată producerii unor accidente (methemoglobinemii, anemii) în urma administrării unor medicamente la pacienți ce au deficite congenitale situate la nivelul unor proteine din hematie, vom prezenta o schemă orientativă a principalelor procese biochimice implicate în protecția hemoglobinei și a globulului roșu (fig. 8.1). Astfel H_2O_2 produsă prin reacții de oxidoreducere ale unor medicamente poate oxida hemoglobina sau induce hemoliză dacă nu s-ar opune sistemele protectoare existente în hematie, formate din glutation-glutation-peroxidază, catalază și superoxid-dismutază, care acționează chiar din momentul producerii peroxidului de hidrogen. Al doilea grup de sisteme protectoare acționează nu asupra cauzei (H_2O_2), ci asupra efectului (methemoglobină) și este format din methemoglobin-reductaze, NADH și NADPH dependente. Prin coenzimele NADH și NADPH, sistemele protectoare sînt legate de glicoliză, care le furnizează prin ramurile respective, Embden-Meyerhof pentru NADH și șuntul pentozofosfat pentru NADPH.

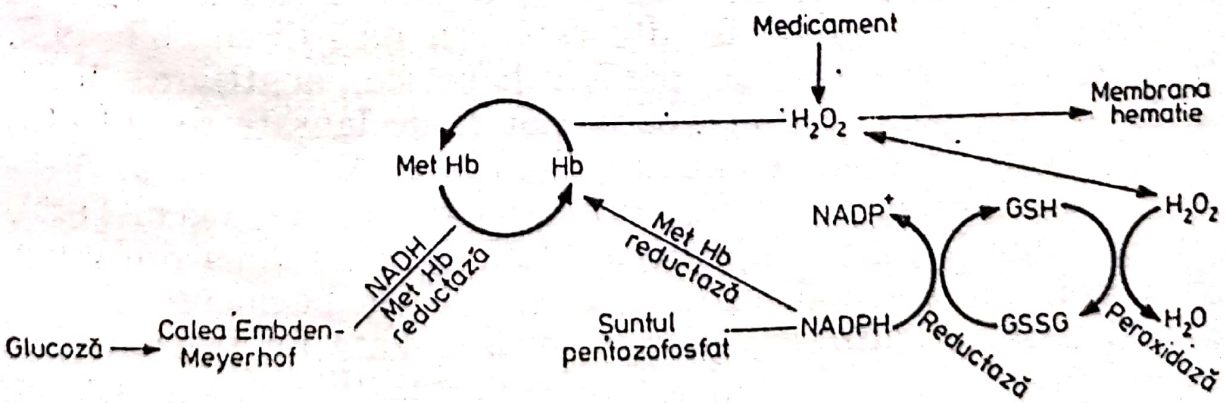


Fig. 8.1. Schema orientativă a sistemelor biochimice protectoare din hematie

Existența mai multor sisteme protectoare în hematie sugerează atît importanța păstrării hemoglobinei în stare redusă și a membranei intacte, dar și posibilitatea creșterii ponderei unui sistem, cînd alt sistem nu poate acționa din cauza unui deficit congenital la nivelul unei proteine. În funcție de gravitatea acestui deficit, a intensității producerii H_2O_2, sistemele protectoare vor fi depășite și vor apare accidente.

8.3. Boli ereditare de interes farmacogenetic

Unele boli ereditare produse prin alterarea genetică a unei funcții metabolice pot fi reproduse, în cîteva caracteristici, prin administrarea unor medicamente specifice. Deși de cele mai multe ori efectul acestor substanțe a fost testat pe animale, s-au descris multe cazuri observate pe om, imprevizibile datorită metabolizării diferite în funcție de specie. Folosirea acestor medicamente a permis cunoașterea mai detaliată a acestor boli, constituind uneori singura posibilitate.

8.3.1. *Porfirii*

Porfiriile constituie un deficit congenital primar al metabolismului nucleului porfirinic, în special al biosintezei. Porfirinuriile sînt, din contra, manifestări secundare ale altor boli, caracterizate prin excreție crescută de coproporfirină și mai rareori de uroporfirină sau precursori. Astfel de boli includ unele neoplazii, insuficiență hepatică, boli hematologice, intoxicații cu metale grele etc. Porfiriile pot fi eritropoetice sau hepatice și la rîndul lor se subdivid în alte categorii încă discutabile [93]. În mai toate cazurile de porfirii hepatice, acutizarea bolii, cu leziuni pe piele sau nervoase, pot fi declanșate de infecții, medicamente, factori endocrini, inaniție. Astfel de medicamente sînt barbiturați [80], sulfonamide [80], estrogeni [105], griseofulvină [5], difenilhidantoină [27], unii alcaloizi din ergot și alcool. Mecanismul prin care aceste medicamente de uz curent produc acutizarea unor porfirii latente nu se cunoaște, ca și apariția unor modificări în concentrațiile fiziologice ale unor parametri biochimici ca raportul lactat/piruvat, iod pro-

teic, colesterol, ACTH, hormon antidiuretic, aparent nelegați între ei sau foarte vag de metabolismul porfirinic [93].

Un pas înainte a fost făcut prin studiile lui Schmid și Schwartz [79], care au demonstrat că administrarea medicamentului Sedormid (alil-izopropilacetamidă AIA) la iepuri produce o formă de porfirie hepatică, caracterizată prin excreție crescută de uroporfirină III și porfobilinogen în urină. Ficatul acestor animale conținea cantități crescute din toți precursorii ciclului porfirinic. În același timp s-a dovedit că Sedormidul produce porfirie și la om, confirmînd astfel prima observație a lui Stokvis în 1899 cu privire la administrarea Sulfonalului structural înrudit.

O altă observație, de data aceasta mai spectaculoasă, a fost obținută prin hexaclorobenzen, un compus folosit pe scară largă ca fungicid. Folosirea inadecvată a grîului tratat cu acest compus a produs în Turcia mii de cazuri de porfirie cutanată temporară, dar foarte asemănătoare cu porfiria *cutanea tarda*, maladie ereditară [61]. DeMatteis și colaboratorii au demonstrat că hexaclorobenzenul produce porfirie la șobolani și iepuri [18]. Un alt exemplu a fost semnalarea apariției unor hiperpigmentări, acnee, hirsutism, erupții pe pielea unor muncitori ce produceau 2,4-diclorofenol și 2,4,5-triclorofenol [10]. Rimington și Zeigler [76] au demonstrat că 1,4-diclorobenzenul și 1, 2, 4-triclorobenzenul, compuși întrudiți, produc porfirie hepatică la șobolani.

Solomon și Figge au produs porfirie experimentală la șoareci și cobai folosind dicarbetoxidinitrocolidină (DDC). Acest compus produce un tip diferit de porfirie față de cel obținut prin administrarea de medicamente [86]. Prin acest compus, cercetătorii dispun de o substanță eficace ce poate produce o porfirie profundă, asemănătoare porfiriei *variegata* în fază acută la om. Dintre medicamente, doar griseofulvina administrată la șoareci produce unele simptome asemănătoare. Reamintim că griseofulvina precipită atacuri de disfuncție neurologică la pacienți cu porfirie acută intermitentă [22]. Interesant este faptul că numai la șoareci administrarea unor largi doze de griseofulvină produce hepatoame multiple, nereproductibile pe alte specii de animale [101]. Aceste studii au fost foarte utile, permițînd lui Granick [25, 59] dezvoltarea unor metode pentru testarea unor medicamente pe embrioni de pui de găină. Astfel Granick [26] a arătat că unele medicamente produc porfirie

în grad semnificativ: bemegride, tolbutamidă, meprobramat, sulfonal, glutethimidă, hidantoine, metiprilon, cloramfenicol, fenobarbital, methol. Tot cu aceste metode s-a descoperit că mulți steroizi cu 19 și 21 carboni avînd configurație 5β-H pot crește semnificativ sinteza porfirinelor în celule embrionare de ficat sau eritropoietice [49, 60] datorită inducerii acid δ-aminolevulinic-sintetazei. Cei mai activi compuși sînt etiocolanolonul, etiocolandiolul, pregnandiolul, care nu reprezintă hormoni secretați primar ci metaboliți ai hormonilor suprarenali sau intermediari ai biosintezei steroizilor. Estrogenii naturali și sintetici sînt inductori moderați. Or, s-a arătat că administrarea estrogenilor la pacienți cu porfirie intermitentă acută produce o excreție crescută urinară de precursori porfirinici [100]. De asemenea, estrogenii determină atît la bărbați, cît și la femei, leziuni neurologice și cutanate în cazuri de porfirii de diferite tipuri [106].

Deocamdată nu s-a putut demonstra o legătură directă, clară, între inducerea enzimei în celulele embrionare de pui de găină și datele clinice, deoarece nu s-a demonstrat inducerea sintetazei în celulele embrionare de mamifere. Oricum, studiile întreprinse oferă o bază pentru noi eforturi, mai ales în domeniul rolului ficatului. Astfel unul din primele efecte ale administrării AIA este hipertrofia celulei hepatice, dar din păcate modificările biochimice asociate cuprind foarte multe metabolisme încît este dificil de a deosebi schimbările primare. Medicamentele și în general compușii care produc porfirie induc o activitate crescută a acid δ-aminolevulinic-sintetazei hepatice [66]. Acum este unanim admis că această enzimă joacă un rol important în reglarea biosintezei hemului în ficat și măduvă. Ulterior s-a găsit că reglarea biosintezei prin sintetază este deosebit de complexă fiind influențată de dietă, hormoni, medicamente și alți compuși chimici [88].

La pacienții cu porfirie intermitentă acută, nivelul sintetazei este mult crescut, coexistînd cu un deficit în steroid Δ^4-5α-reductază [50]. Din cauza acestui deficit, metabolizarea hormonilor steroizi este deviată spre structuri 5β în loc de 5α, calea normală. Porfiriile induse de medicamente constituie un exemplu pentru cooperare între cercetări de biochimie și farmacogenetică.

8.3.2. *Metabolismul bilirubinei*

După cum se știe, bilirubina este formată predominant din eritrocite bătrîne în țesutul reticuloendotelial și este constituită dintr-un tetrapirol lipidosolubil legat reversibil de albumină. De obicei raportul bilirubină: albumină este 1 : 1 și bilirubina este în competiție pentru această combinare cu alți constituenți plasmatici (acizi grași liberi) sau medicamente sulfonamide). În cap. 1 s-au prezentat condițiile apariției icterului noului-născut. Transportul bilirubinei neconjugate din plasmă în ficat este puțin cunoscut și presupune disocierea bilirubinei din combinarea cu albumina și existența unui acceptor pentru bilirubină [6]. În hepatocit bilirubina este transportată spre reticulul endoplasmic unde fiecare moleculă este conjugată cu două molecule de acid glucuronic cu ajutorul glucuronil transferazei.

Șobolanii din sușa Gunn, cît și oamenii cu sindromul Crigler-Najjar prezintă o hiperbilirubinemie neconjugată, nehemolitică, cronică. În ambele cazuri deficitul determinat genetic este localizat la nivelul glucuronil-transferazei. Deși multe medicamente pot interfera cu formarea glucuronizilor *in vitro* [58], în special steroizi, numai cîteva au fost implicate în producerea icterului la om. Astfel antibioticul novobiocina declanșează un icter sever la nou-născuți, cît și la unii adulți [28], dovedindu-se a fi și un inhibitor al glucuronil-transferazei [37].

Pacienții cu sindroamele Dubin-Johnson și Rotor [2] prezintă o capacitate redusă de a excreta bilirubina conjugată și bromosulfonftaleina din ficat. Administrarea substanțelor radio-opace ca acid iodopanoic la pacienții cu sindromul Dubin-Johnson nu permite vizualizarea veziculei biliare. Tot la aceiași pacienți, spre deosebire de sindromul Rotor, s-a observat o acumulare de pigment negru în ficat, de tip melaninic.

Steroizii anabolici alchilați cu 17 C de tip noretandrolonă administrați timp mai îndelungat la unii pacienți și la șoareci determină o hiperbilirubinemie [78], cît și o capacitate redusă de a excreta bromsulfonftaleina. Același efect a fost obținut la unele femei care au folosit Enovid, pentru controlul nașterilor.

Scanned with OKEN Scanner

8.4. Variații genetice care modifică răspunsul la medicamente

8.4.1. *Rezistența la anticoagulante*

Variabilitatea răspunsului omului la medicamente este de obicei continuu, prezentînd o curbă de distribuție de frecvență unimodală. Cînd în răspunsurile obținute se pot deosebi grupuri distincte poate fi suspectat un defect genetic și se impune studiul familiei respectivului pacient. Medicamentele anticoagulante cumarinice sînt ideale pentru studii farmacogenetice deoarece pacienții au în general mecanisme hemostatice normale, iar metabolizarea și efectul biologic pot fi măsurate cantitativ. De-abia în ultimii ani s-au observat la om și șobolan variații discontinue determinate genetic și manifestate ca o rezistență foarte mare la acțiunea acestor medicamente [71]. Ulterior s-a găsit că aceste variații pot fi determinate atît genetic, cît și dobîndit, și se pot manifesta fie ca o rezistență, fie ca o sensibilitate excesivă la acțiunea medicamentelor cumarinice. Aceste variații pot fi produse de diferențele în capacitatea ficatului de a produce factori de coagulare dependenți de vitamina K sau de metabolismul vitaminei K (depozitare, afinitate receptori) etc. Condițiile dobîndite care produc creșterea răspunsului protrombinopenic sînt asociate cu un deficit hepatic sau în vitamină K. Vitaminele K necesită pentru absorbție prezența acizilor biliari, așa încît blocarea tractului intestinal prin icter obstructiv, perturbarea absorbției intestinale (fistulă gastrocolică, colită ulcerativă, steatoree), sterilizarea tractului intestinal potențează efectul protrobinopenic al cumarinelor.

Alte forme de insuficiență hepatică ca hepatită virală, toxică, post-necrotică, ciroză Laennec, cancer pot fi asociate cu o capacitate scăzută în a produce factori de coagulare dependenți de vitamina K, creind deci o sensibilitate la medicamente cumarinice. Pacienții cu insuficiență cardiacă severă, cu ficatul afectat, sînt sensibili la cumarinice [71].

În tabelul III sînt prezentate principalele interacțiuni între anticoagulantele cumarinice și unele medicamente larg folosite. În aceste cazuri, variațiile sensibilității sînt mai puțin determinate genetic, mai probabil dobîndite. Totuși în condiții similare variația acestei interacțiuni este foarte mare, depinzînd în bună parte de factorul individual. Atît sensibilitatea

8.4. Variații genetice care modifică răspunsul la medicamente

8.4.1. *Rezistența la anticoagulante*

Variabilitatea răspunsului omului la medicamente este de obicei continuu, prezentînd o curbă de distribuție de frecvență unimodală. Cînd în răspunsurile obținute se pot deosebi grupuri distincte poate fi suspectat un defect genetic și se impune studiul familiei respectivului pacient. Medicamentele anticoagulante cumarinice sînt ideale pentru studii farmacogenetice deoarece pacienții au în general mecanisme hemostatice normale, iar metabolizarea și efectul biologic pot fi măsurate cantitativ. De-abia în ultimii ani s-au observat la om și șobolan variații discontinue determinate genetic și manifestate ca o rezistență foarte mare la acțiunea acestor medicamente [71]. Ulterior s-a găsit că aceste variații pot fi determinate atît genetic, cît și dobîndit, și se pot manifesta fie ca o rezistență, fie ca o sensibilitate excesivă la acțiunea medicamentelor cumarinice. Aceste variații pot fi produse de diferențele în capacitatea ficatului de a produce factori de coagulare dependenți de vitamina K sau de metabolismul vitaminei K (depozitare, afinitate receptori) etc. Condițiile dobîndite care produc creșterea răspunsului protrombinopenic sînt asociate cu un deficit hepatic sau în vitamină K. Vitaminele K necesită pentru absorbție prezența acizilor biliari, așa încît blocarea tractului intestinal prin icter obstructiv, perturbarea absorbției intestinale (fistulă gastrocolică, colită ulcerativă, steatoree), sterilizarea tractului intestinal potențează efectul protrobinopenic al cumarinelor.

Alte forme de insuficiență hepatică ca hepatită virală, toxică, post-necrotică, ciroză Laennec, cancer pot fi asociate cu o capacitate scăzută în a produce factori de coagulare dependenți de vitamina K, creind deci o sensibilitate la medicamente cumarinice. Pacienții cu insuficiență cardiacă severă, cu ficatul afectat, sînt sensibili la cumarinice [71].

În tabelul III sînt prezentate principalele interacțiuni între anticoagulantele cumarinice și unele medicamente larg folosite. În aceste cazuri, variațiile sensibilității sînt mai puțin determinate genetic, mai probabil dobîndite. Totuși în condiții similare variația acestei interacțiuni este foarte mare, depinzînd în bună parte de factorul individual. Atît sensibilitatea

TABELUL III

Medicamente care modifică efectul anticoagulantelor cumarinice

Medicament	*Efect asupra acţiunii cumarinicelor*	*Mecanism*	*Bibliografie*
Cincofen	Sensibilitate crescută	Absorbţie micşorată a vitaminei K	[70]
Fenotiazine	Sensibilitate crescută	(colestază)	[70]
Fenilbutazonă		Deplasare din combinaţia cu albumina	[1, 40]
Phenyramidol	Sensibilitate crescută	Inhibă sist. microzomial hepatic	[87]
Hormoni tiroidieni	„ „	Micşorează lipidele serice	[70]
Benziodaronă, Clofibrat, Steroizi C 17, anabolici	„ „	?	[70]
Dextrotiroxină	„ „	Creşte afinitatea medicam. faţă receptor	[40]
Fenobarbital	„ micşorată	Induce sist. microzomial hepatic	[55]
Hidrat de cloral, Griseofulvină		„ „ „	[40]
Tolbutamidă	„ variabilă	„ „ „	[40]

crescută, cît şi cea scăzută pot fi datorate unor mecanisme hepatice diferite sau extrahepatice. În plus există condiţii fiziologice care modifică reactivitatea (graviditatea), în care trebuie folosite doze mari de anticoagulante cumarinice din cauza nivelului crescut al factorilor de coagulare. La om, rezistenţa ereditară la cumarinice pare să fie datorită unui defect în metabolizarea acestor compuşi, permiţîndu-le să funcţioneze ca antimetaboliţi, fiind în competiţie cu vitamina K şi factorii de coagulare dependenţi [70].

8.4.2. *Noi domenii de investigaţie*

Aplicaţiile terapeutice complexe, moderne, implică utilizarea unor medicamente capabile să modifice propria lor durată de acţiune sau a altora administrate simultan, şi în acest caz este foarte importantă mărimea diferenţelor individuale [75].

În cazul unei populații normale, omițînd deficitele congenitale prezentate mai înainte, putem presupune că pacienții au în sînge un nivel asemănător dintr-un inductor medicamentos. Or, lucrări destul de recente au arătat că pentru fenobarbital, inductorul medicamentos cel mai utilizat, se observă largi diferențe determinate genetic în răspunsul inductiv [95, 96]. Aceste variații individuale sînt independente de concentrația absolută a medicamentului în sînge. Studiile efectuate pe gemeni [96] au arătat că în reducerea semivieții antipirinei, ca urmare a administrării fenobarbitalului, contribuția eredității depășește 90%. În acest sens trebuie menționat că la șoareci s-a observat mai de mult [95] alterarea răspunsului la hexobarbital de către factorii genetici. Deoarece genele care controlează variațiile individuale în inducția prin fenobarbital pot fi diferite de genele care controlează variațiile individuale în metabolizarea fenilbutazonei sau antipirinei, interpretarea unui studiu genetic va fi foarte dificilă, dat fiind larga folosire a acestor medicamente și marea lor influență reciprocă. Deoarece sute de compuși pot induce sistemul microzomial hepatic, metabolizant, efectele inhibitoare observate cu unele medicamente comune (antipirină, allopurinol) pot fi cu greutate interpretate [97].

Studiile biochimice au arătat marea răspîndire a polimorfismului printre enzime; aproape toate enzimele cu mase moleculare mai mari de 80—100.000, prezintă forme moleculare multiple, cu proprietăți cinetice diferite. În acest sens nu este de mirare existența unei mari varietăți determinate genetic ale unor variante în izoenzimele cunoscute. Desigur în cele mai multe cazuri aceste variații trec neobservate, apărînd însă în răspunsul individual diferit la acțiunea unor medicamente.

BIBLIOGRAFIE

1. P. M. Aggler, R. A. O'Reilly, P. E. Kowitz, *New Engl. J. Med.*, **276**, 496 (1967).
2. I. M. Arias, *Ann. Rev. Med.*, **17**, 257 (1966).
3. D. Beale, H. Lehmann, *Nature*, **207**, 259 (1965).
4. R. Benesch, R. E. Benesch, *Nature*, **202**, 775 (1962).
5. A. Berman, R. L. Franklin, *J. Am. Med. Assoc.*, **192**, 1005 (1965).
6. L. H. Bernstein, J. B. Ezzer, L. M. Gartner, I. M. Arias, *J. Clin Invest.*, **45**, 1194 (1966).

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 9

PROSTAGLANDINELE ȘI IMPLICAȚIILE LOR FARMACOLOGICE

De la efectuarea primelor observații, în urmă cu 45 ani, privind efectele lichidului seminal uman asupra uterului izolat [57, 100] cercetările în domeniul prostaglandinelor au cunoscut, mai ales în ultimii 15 ani, un progres deosebit. S-a stabilit ubicuitatea prostaglandinelor în regnul animal în aproape toate tipurile de țesuturi. Au fost stabilite tipurile structurale, căile de biosinteză și degradare, principalele funcții și corelații funcționale etc.

Studiul efectelor diferitelor prostaglandine la nivelul celulelor și țesuturilor organismului a evidențiat implicația acestora în controlul și modularea unor funcții esențiale, cum sînt: tonusul musculaturii netede, funcțiile aparatului genital, răspunsul inflamator, funcția renală, controlul multiplicării celulare, funcțiile sistemului nervos, lipoliză etc.

Modificările cantitative ale prostaglandinelor au putut fi corelate cu diversele stări patologice, cum sînt: șocul, hipertensiunea și insuficiența circulatorie, astmul bronșic, embolia, ulcerul, gastrita, alergia, avortul habitual, tumori maligne etc.

Implicația prostaglandinelor în realizarea efectelor terapeutice sau adverse ale unor medicamente precum și perspectiva utilizării unora dintre acestea în terapia hipertensiunii arteriale, astmului bronșic, ulcerului gastro-duodenal, în declanșarea travaliului la termen sau în avortul terapeutic etc. subliniază interesul farmacologic al acestor compuși.

9.1. Structura chimică, nomenclatura

Prostaglandinele sînt compuși biologic activi, analogi ai acidului prostanoic. În funcție de structura acidului gras esențial precursor, prostaglandinele (PG) sînt de trei tipuri: PG_1

derivate din acidul 8,11,14-eicosatrienoic (bishomo-γ-linolenic), PG_2 din 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic (arahidonic) și PG_3 derivate din 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic.

Seria PGE este caracterizată prin prezența unui grup carbonil la C_9 și grup hidroxil la C_{11} și C_{15}. Seria PGF conține grupări hidroxil la C_9, C_{11} și C_{15} iar seria PGA poate fi considerată ca derivată din seria PGE cu $\Delta^{10,11}$. Seriile PGC și PGB sînt izomeri $\Delta^{11,12}$ și respectiv $\Delta^{8,11}$ ai seriei PGA (fig. 1)

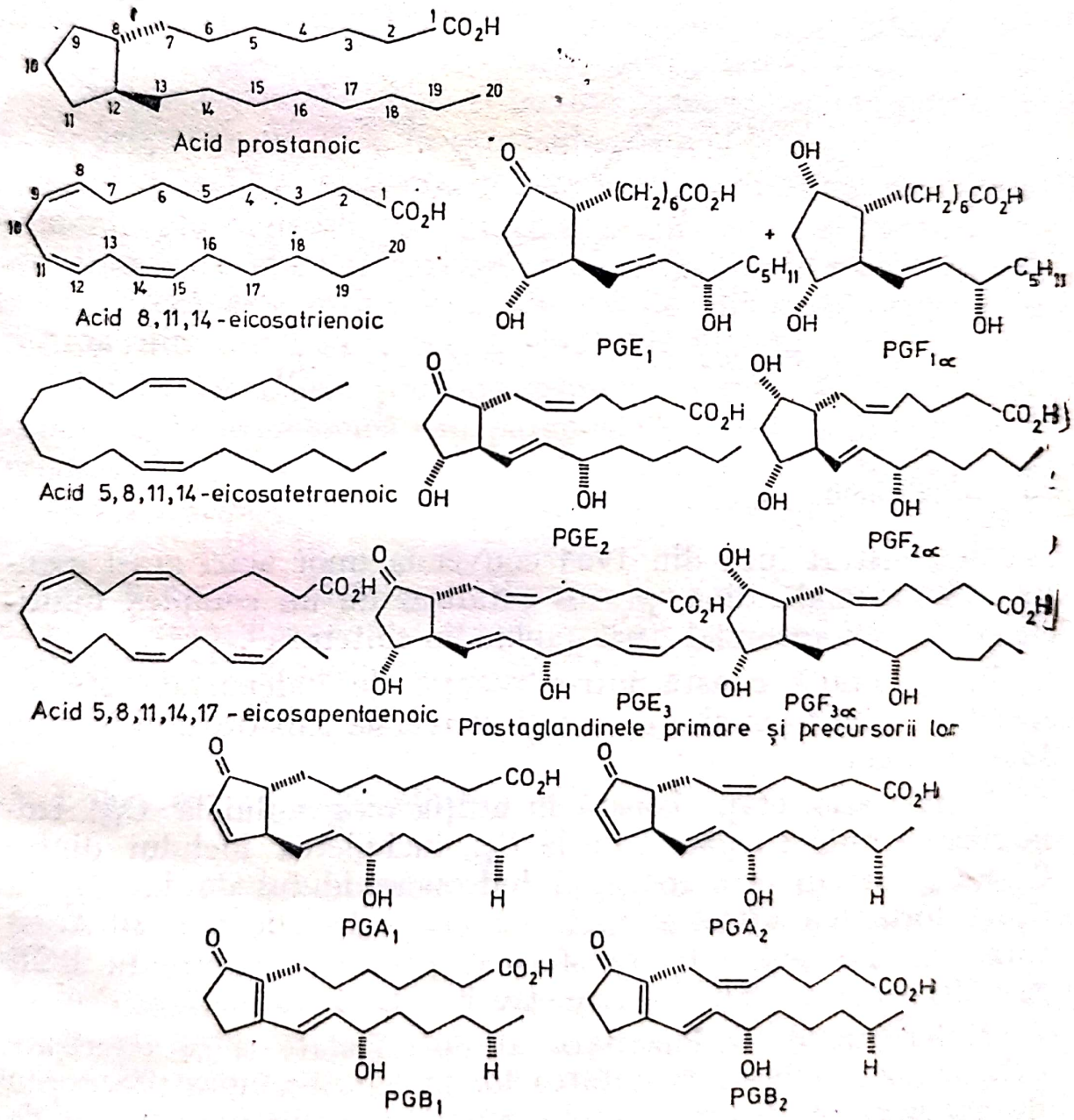


Fig. 9.1. Prostaglandine naturale dehidrogenate

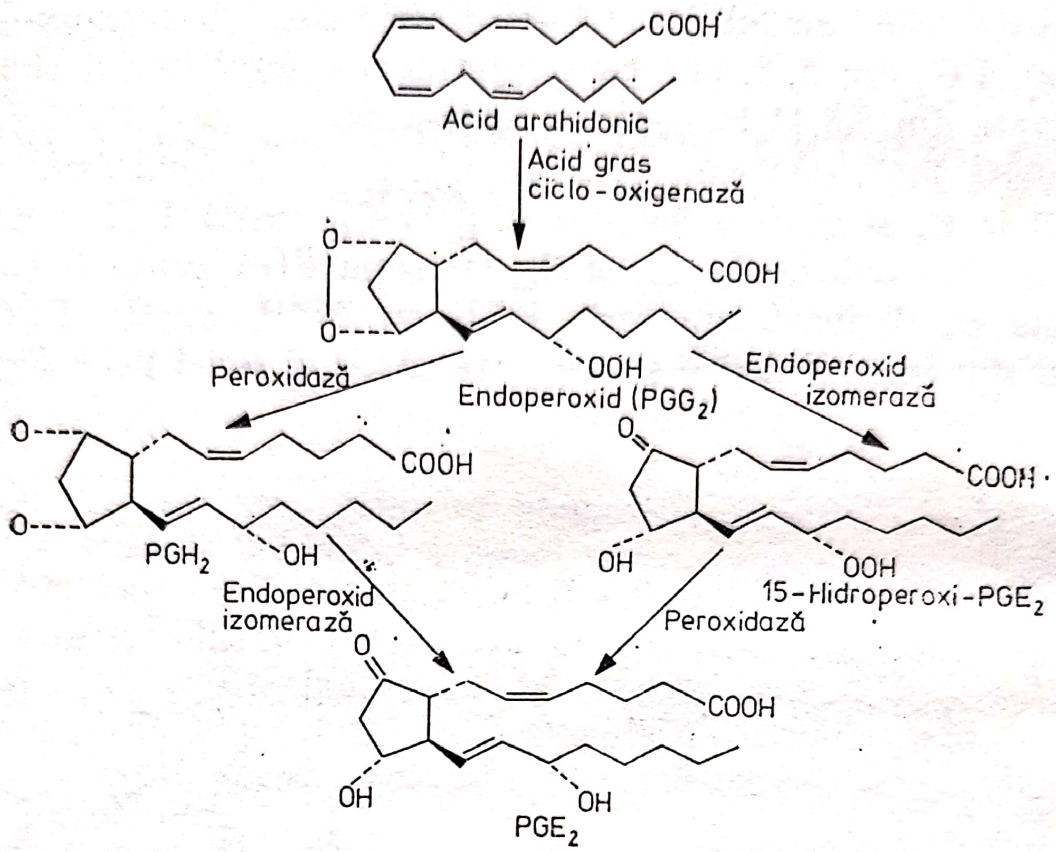


Fig. 9.2. Căile de biosinteză ale PGE_2

9.2. Biosinteză

S-a demonstrat încă din 1964 conversia unor acizi graşi esenţiali în prostaglandine, proces catalizat de un complex multienzimatic microzomial „prostaglandin-sintetaza". [17].

Prima etapă constă într-o reacţie de îndepărtare stereospecifică a hidrogenului $\omega - 8$ şi conversia substratului într-un hidroperoxid.

Următoarea etapă constă în adiţia oxigenului la C_{15}, izomerizarea dublei legături de la C_{13}, închiderea inelului dintre C_8 şi C_{12}, atacul prin oxigenul hidroperoxidului de la C_{11} la C_9 şi formarea astfel a unui endoperoxid ciclic (fig. 2). Acest ultim produs poate fi transformat prin izomerizare în PGE sau PGB sau prin clivaj reductiv în PGF.

Moleculele de endoperoxizi au fost izolate şi caracterizate [33], evidenţiindu-se activitatea lor biologică asupra procesului de agregare plachetară, asupra contracţiei musculaturii netede şi asupra lipolizei, efecte mediate prin nucleotizi ciclici [28, 29].

Prostaglandinele E_1, E_2, E_3, $F_{1\alpha}$, $F_{2\alpha}$ și $F_{3\alpha}$ sînt considerate structuri primare.

Pentru activitatea prostaglandin-sintetazei sînt necesari o serie de cofactori care pot fi substituiți *in vitro* cu glutationul redus care pare a fi cvasi specific, cu unii cationi cum sînt Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} sau cu adrenalină, hidrochinonă etc.

Prostaglandin-sintetaza are o distribuție largă — în toate țesuturile la mamifere, activitatea sa variind semnificativ în funcție de țesutul considerat.

Țesuturile de mamifere în funcție de capacitatea de biosinteză a PGE_1 din precursorul tritiat pot fi împărțite în trei categorii: care convertesc 10 — 40% (rinichi, pulmon), 3% (intestin) și respectiv 1% (splină, aortă etc.). Excepție fac veziculele seminale de ovine și bovine care convertesc precursorul în proporție de 75% în prostaglandine [17].

Spre deosebire de aminele biogene, acetilcolina și diferiți hormoni, prostaglandinele nu sînt depozitate în țesuturi ci sînt sintetizate imediat înaintea eliberării. Rezultă că procesul de biosinteză este strîns legat de cel de eliberare, stimularea acestuia din urmă crescînd implicit biosinteza.

Stimulul formării prostaglandinelor poate fi de natură fiziologică, farmacologică sau patogenică și care, prin activarea fosfolipazei A, duce la scindarea fosfolipidelor din membranele celulare furnizînd substratul, respectiv acizii grași esențiali ce sînt convertiți în prostaglandine.

Se consideră că fosfalipaza A reprezintă un factor regulator, enzimă declanșatoare a sintezei tisulare a prostaglandinelor și etapă limitantă a acestui proces [52].

9.3. Eliberarea prostaglandinelor

Eliberarea prostaglandinelor ca răspuns la acțiunile diferiților stimuli fiziologici sau patogenici se realizează în cantități de ordinul nanogramelor, detecția acestor concentrații fiind posibilă prin metode biologice pe organe izolate cu o înaltă sensibilitate sau prin metode analitice complexe. Eliberarea prostaglandinelor este asociată sau este consecința interacției dintre o celulă dată și un anumit stimul [78, 79]. Se admite astfel ca eliberarea prostaglandinelor la nivelul musculaturii netede

este consecinţa contracţiei acesteia, fenomen evidenţiat în cazul contracţiei splenice prin catecolamine sau prin stimularea nervilor splenici [20, 26].

S-a demonstrat însă că eliberarea prostaglandinelor din splină nu este în mod necesar asociată cu contracţia acesteia, sugerîndu-se că acest proces este consecinţa unor modificări ale membranei celulare [6, 78, 79] sau a activării sistemului reticulo-endotelial [26].

Această modificare a membranei celulare poate avea un caracter fiziologic, cum e cazul contracţiei musculaturii netede, sau un caracter patologic, cum sînt anafilaxia, inflamaţia etc. Eliberarea prostaglandinelor ca răspuns al modificărilor membranare poate fi considerat un proces de autoapărare a celulei, de adaptare, la stimulul perturbator, de limitare a efectelor acestuia.

Dintre agenţii cunoscuţi ca eliberatori de prostaglandine, în afară de cei termici, radiaţiile ionizante şi U.V. şi agenţii mecanici, menţionăm agenţii farmacologici ca bradichinina, anafilatoxina, acidul arahidonic etc.

9.4. Receptorul prostaglandinic

S-a demonstrat că anumite sisteme enzimatice membranale ce conţin grupări funcţionale sulfhidrilice sînt sensibile la prostaglandine, ceea ce a sugerat implicaţia acestei grupări funcţionale în legarea şi acţiunea prostaglandinelor.

S-a arătat de asemenea că blocanţii grupărilor sulfhidril abolesc răspunsul inflamator secundar eliberării prostaglandinelor. Expunerea uterului izolat de şobolan la concentraţii adecvate de dithiotreitol (DT), un reducător al grupărilor disulfidice, scade răspunsul la PGE_2. Inhibiţia menţionată este dependentă de doză şi de timpul de expunere atingînd valoarea maximă după 30 minute. Utilizările unui agent oxidant al grupărilor sulfhidril de tipul acidului 5,5′-ditiobis-(2-nitrobenzoic) (DTNB) duce la reversarea completă a blocajului prin DT. Efectul de reversare al DTNB este blocat însă de substanţe alchilante ale grupărilor sulfhidril de tipul *N*-etilmaleimidei [47, 48, 49].

Faptul că atît agenţii care reacţionează cu grupările sulfhidril cît şi cu cele disulfidice inhibă reversibil acţiunea prosta-

glandinelor, fenomen fără consecință asupra acțiunii altor agoniști, sugerează că proteina implicată este specifică pentru interacția cu prostaglandinele. Este remarcabil faptul că atît PGE_2 cît și acidul 7-oxa-13-prostanoic, antagonist specific competitiv al prostaglandinelor, protejează față de efectele DT, făcînd probabil indisponibile grupările funcționale respective la acțiunea agentului reducător. Aceste grupări disulfidice, critice pentru acțiunea prostaglandinei, sînt localizate la nivelul sau în vecinătatea imediată a centrului de interacție a receptorului prostaglandinic.

Pe baza acestor date se admite că [47, 48, 49] receptorul prostaglandinic conține ca o componentă majoră o moleculă proteică cu grupări disulfidice localizate în/sau lîngă locul de interacție al receptorului, grupări accesibile și modificabile prin agenți chimici (DT, DTNB) și fizici (UV). Receptorul prostaglandinic poate fi de asemenea interconvertit între o conformație reversibilă și areactivă și o conformație complet reactivă.

Cîteva caracteristici funcționale ale receptorului prostaglandinic pot fi deduse din experimentările efectuate pe uter izolat cu $PGE_1 - H^3$.

Incubarea uterului intact cu $PGE_1 - H^3$ [47] evidențiază o viteză de legare reversibilă, dependentă de doză. Această viteză de legare este maximă în primele 5 s, scăzînd exponențial la un nivel minim după 120 s. Maximum de fixare a PGE_1 la nivelul acestui organ se realizează în 10 s, înainte de declanșarea răspunsului contractil. Cea mai mare parte din prostaglandină (95%) realizează o legătură ușor reversibilă. Modificarea vitezei de legare a prostaglandinelor prin diverși agenți care reduc grupările disulfhidice are consecințe directe asupra răspunsului farmacologic la prostaglandine, diminuarea legării acestora scăzînd sau abolind implicit răspunsul contractil al uterului.

9.5. Inactivarea enzimatică a prostaglandinelor

Au fost identificate patru modalități de inactivare enzimatică a prostaglandinelor. Aceste procese constau în: geneza unor 15-ceto derivați, catalizată de prostaglandin 15-hidroxi-

dehidrogenaza (PGDH), saturarea dublei legături Δ^{13}, catalizată de prostaglandin-reductaza, reducerea grupării cetonice prin ceto-reductază şi oxidarea lanţului lateral fie în poziţia β fie în poziţie omega (β sau ω oxidare) (fig. 9.3).

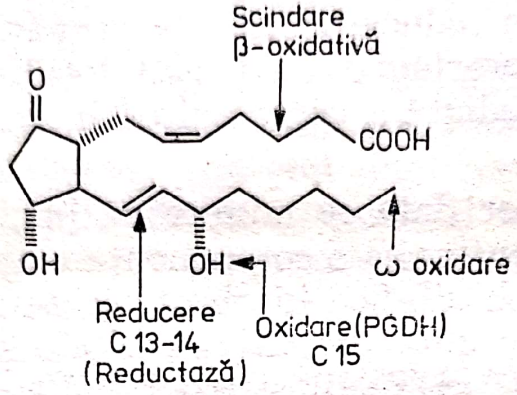


Fig. 9.3. Degradarea metabolică a prostaglandinelor

Procesul de oxidare catalizat de PGDH pare a fi cel mai important, enzima fiind distribuită larg în ţesuturile diverselor specii de mamifere. PGDH este o enzimă NAD^+ — dependentă şi are ca substraturi preferenţiale PGE_1 şi PGE_2, şi mai puţin PGE_3, PGF şi PGA. Tipul B de prostaglandine nu este supus deloc procesului de oxidare. Derivaţii cetonici rezultaţi din oxidarea catalizată de PGDH posedă o activitate biologică slabă, rezultînd că acest proces constituie o modalitate importantă de inactivare *in vivo* a prostaglandinelor.

Inactivarea metabolică a prostaglandinelor se realizează rapid *in vivo*. Astfel administrarea de PG radiomarcate, pe cale i.v., a permis să se estimeze că, în 90 secunde, se produce o inactivare în proporţie de 90%. Excreţia urinară este de asemenea foarte rapidă, realizîndu-se în proporţie de peste 90% în cinci ore, dintr-o doză administrată pe cale i.v. [88].

Utilizîndu-se inhibitori ai PGDH de tipul polifloretinfosfatului, difloretinfosfatului, *N*-etilmaleimidei şi *p*-clormercurifenilsulfatului s-a realizat, pe plămîn izolat de cobai, blocarea inactivării prostaglandinelor la nivelul patului vascular pulmonar [79].

9.6. Efectele farmacologice ale prostaglandinelor

9.6.1. *Interrelațiile prostaglandine-sistem adrenergic*

PGE_1 reduc răspunsul presor la adrenalină, noradrenalină, angiotensină și vasopresină la diferite specii de animale [40]. Inhibiția lipolizei prin catecolamine de către PG poate fi interpretată ca o consecință a inhibiției adenilat-ciclazei, implicit a scăderii concentrației AMP ciclic (vezi cap. 5), ceea ce nu corespunde însă în privința fenomenului descris mai sus. Alte efecte ale CA sînt inhibate de PGE_1 și $PGF_{2\alpha}$ indiferent dacă aceste efecte sînt de natură stimulatorie sau inhibitorie. Pe anumite preparate de mușchi neted, antagonismul menționat este precedat de potențare, ceea ce a permis sugestia că PGE_1 crește afinitatea CA pentru locurile receptoare, proces cu implicații importante în modularea răspunsului mușchilor netezi la CA. Pe de altă parte este stabilit că stimularea nervilor simpatici sau administrarea de CA are drept consecință eliberarea de PG [41, 42, 43]. În schimb, în numeroase țesuturi inervate adrenergic, s-a demonstrat că PGE eliberate la stimulare nervoasă inhibă eliberarea de CA [36, 37]. Inhibiția prostaglandin-sintetazei cu substanțe de tip aspirinic sau prin analogi de substrat abolește eliberarea PG prin stimulare nervoasă și crește eliberarea de CA [21, 36]. Acest efect inhibitor al PG s-ar realiza la nivel presinaptic printr-un sistem de control de tip *feed-back* negativ, asupra eliberării de CA din terminația nervoasă. Acest sistem de control acționează în paralel și, cel puțin în parte, independent de sistemul de control prin intermediul receptorilor presinaptici α adrenergici, [36] respectiv eliberarea de CA fiind invers proporțională cu tonusul funcțional al acestor receptori [15, 16].

9.6.2. *Interrelațiile prostaglandine*-AMP ciclic

Interrelațiile complexe ale prostaglandinelor cu sistemul AMP ciclic au fost prezentate, în parte, în capitolul privind interrelațiile farmacologice ale nucleotidului ciclic respectiv (cap. 5), precum și în cadrul prezentului capitol cu ocazia menționării unor funcții și implicații farmacologice ale prostaglandinelor.

Scanned with OKEN Scanner

În funcţie de ţesutul considerat, prostaglandinele cresc cantitatea de *c*AMP sau o scad prin intermediul modificării concordante a adenilat-ciclazei. Scăderile în unele ţesuturi a *c*AMP s-ar datora interferenţei prostaglandinelor cu legarea ATP la adenilat-ciclază, sugerîndu-se existenţa a două locuri de legare a agoniştilor la nivelul ciclazei, unul dintre acestea fiind blocat de către PGE_1 [39].

9.6.3. *Răspunsul inflamator*

Se admite că prostaglandinele sînt factori esenţiali în declanşarea răspunsului inflamator. Răspunsul inflamator este secundar eliberării prostaglandinelor tisulare, acest proces fiind declanşat nespecific de agenţi mecanici, fizici, chimici, infecţioşi etc. PGE_1 şi PGF generează eritemul, fiind eficiente în doze cuprinse între 1 ng — 1 μg. Efectul vascular al PG este de lungă durată (pînă la 10 ore) şi contracarează efectul vasoconstrictor al NA şi angiostensinei. Este posibil ca efectul vascular durabil al PG să fie consecinţa scăderii tonusului adrenergic periferic prin inhibiţia eliberării noradrenalinei (vezi cap. „SISTEMUL ADRENERGIC"). Eritemul este generat prin relaxarea muşchiului neted vascular al arteriolelor şi venulelor. Secundar acţiunii PG apare însă şi edemul produs de creşterea permeabilităţii vasculare, rezultat al contracţiei celulelor endoteliale venulare.

În comparaţie cu histamina, PGE_1 produce un grad similar de eritem dar de durată mai mare, în timp ce edemul produs este de mai mică intensitate.

Asocierea PGE_1 cu histamina sau cu bradichinina realizează un efect potenţiat şi nu o simplă adiţie. Se sugerează că prostaglandinele sensibilizează vasele sanguine la efectul permeabilizant al altor mediatori [21, 23], cum sînt histamina şi bradichinina.

Concomitent cu efectele menţionate, PG şi în special PGE_1 produc o hiperalgezie de lungă durată. În geneza durerii se admite o sensibilizare prin prostaglandine la producerea acesteia de către alte substanţe endogene de tipul bradichininei [21]. Febra este asociată uzual procesului inflamator. PGE_1 este unul din cei mai eficienţi piretogeni cunoscuţi, în condiţiile administrării în ventriculii cerebrali sau în hipota-

TABELUL I

Efecte farmacologice ale prostaglandinelor

Sistem cardiovascular

Efect inotrop pozitiv
Efect cronotrop pozitiv
Creșterea debitului cardiac
Creșterea presiunii arteriale
Creșterea permeabilității capilare
PGE și PGA: Scăderea presiunii arteriale, scăderea presiunii venoase
— creșterea fluxului sanguin coronar

Sistem gastro-intestinal

— scăderea acidității gastrice
— creșterea motilității intestinale, vomă, diaree

Aparat respirator

PGE_1 și PGE_2: Bronhodilatație
$PGF_{2\alpha}$: Bronhoconstricție
Potențarea histaminei

Ochi

— mioză
— creșterea presiunii intraoculare

Piele

— Creșterea permeabilității
— Hiperemie
— Durere

Sistem hematologic

PGE_1: Inhibiția agregării trombocitare și eliberarea enzimelor lizozonale leucocitare
— creșterea deformabilității hematiilor
— eritropoeza
— migrarea leucocitară
PGE_2: stimularea agregării trombocitare
— creșterea rigidității hematiilor

Rinichi

— Creșterea fluxului sanguin renal, nitriureză, kaliureză și eliminare de apă
— Redistribuție sanguină intrarenală
— Antagonizarea efectului vasopresinei

Sistem de reproducere

— cresc motilitatea și tonusul uterin
— Induc avortul și travaliul
— Luteoliză

Metabolism

— Cresc sau scad (în funcție de țesut) nivelul AMP ciclic
PGE_1: antilipolitic

S.N.C. și periferic

PGE_1 și PGE_2: modificări comportamentale la animale.
— stimulează hipotalamusul (febră, *releasing factor*)
— inhibă reflexele spinale
— inhibă eliberarea de N.A. prin stimulare nervoasă

Scanned with OKEN Scanner

lamusul anterior. Acest efect este corelat cu doza de PG utilizată şi durează aproximativ 3 ore. Date experimentale sugerează de asemenea faptul că PG pot fi factori leucotaxici, realizînd acumularea de monocite, favorizînd conversia procesului inflamator acut în proces cronic.

9.6.4. *Efecte asupra musculaturii netede*

9.6.4.1. Muşchi neted vascular

Prostaglandinele din seria A şi E scad presiunea arterială şi presiunea venoasă reducînd fluxul sanguin regional. La nivelul vaselor s-a înregistrat un efect net vasodilatator.

La om numai vasele placentare răspund prin vasoconstricţie la administrare de prostaglandine. Efectele de creştere a permeabilităţii capilare sînt analizate în contextul procesului inflamator. La un mare număr de specii animale, prostaglandinele cresc debitul coronar. PG produc de asemenea vasodilataţie în teritoriul renal şi vasodilataţie funcţională la nivelul glandelor endocrine. Spre deosebire de acestea, prostaglandinele serie F, în special PGF_2, produc creşterea presiunii arteriale sistemice şi scăderea fluxului sanguin arterial regional, precum şi contracţia venelor din diferite teritorii.

Răspunsul constrictor venos la PGE_2 nu este influenţat de fentolamină, rezerpină, hexametoniu sau secţionarea fibrelor simpatice, sugerînd un mecanism direct de acţiune [66].

9.6.4.2. Muşchi neted bronşic

Prostaglandinele E_1 şi E_2 produc bronhodilataţie la diferite specii de animale inclusiv la om. La om administrarea de aerosoli de săruri de trietanolamină ale PGE_1 sau PGE_2 permite obţinerea unei bronhodilataţii la astmatici comparabili ca durată cu cea dată de izoprenalină [12, 87].

În tabelul II sînt prezentate [12] eficienţa comparată a diferitelor PG şi izoprenalinei faţă de diferite modalităţi de spasm bronşic la cobai.

TABELUL II

Inhibiția spasmului bronșic produs de 5-hidroxitriptamină, histamină și acetilcolină de către PG și izoprenalină administrate i.v. la cobai.

Compusul	*5-Hidroxitriptamină*	*Histamină*	*Acetilcolină*
Izoprenalină	$ED_{50} = 346 \cdot 10^{-12}$ M/kg	$415 \cdot 10^{-12}$ M/kg	$3{,}42 \cdot 10^{-9}$ M/kg
PGE_1	$ED_{50} = 4{,}1 \cdot 10^{-9}$ M/kg	$2 \cdot 10^{-9}$ M/kg	$9{,}2 \cdot 10^{-9}$ M/kg
PGA_1	$ED_{50} = 141 \cdot 10^{-9}$ M/kg	$34 \cdot 10^{-9}$ M/kg	$188 \cdot 10^{-9}$ M/kg
PGA_2	$ED_{50} = 49{,}4 \cdot 10^{-9}$ M/kg	$42{,}2 \cdot 10^{-9}$ M/kg	—

Spre deosebire de PG menționate ca bronhodilatatoare, $PGF_{1\alpha}$ și $PGF_{2\alpha}$ produc bronhoconstricție antagonizată de PGE_2 sau izoprenalină.

9.6.4.3. Mușchi neted și unele funcții ale tubului digestiv

Este bine cunoscut efectul stimulant la PGE și PGF asupra musculaturii netede intestinale, efect utilizat și pentru dozarea lor biologică.

La animale și la om administrarea prelungită de PG generează relativ frecvent defecație, diaree și dureri abdominale prin creșterea motilității intestinale. S-a demonstrat de asemenea că PGE_1, PGA_1 și PGF_2 inhibă absorbția jejunală a apei și electroliților, stimulînd de asemenea secreția de apă și electroliți la acest nivel. S-a sugerat că toxina holerică eliberează PG din mucoasă intestinală care stimulează adenilat-ciclaza, cu creșterea consecutivă a AMP ciclic, producînd fenomenele cunoscute — hipersecreție intestinală, diaree și dureri abdominale. Tratamentul cu aspirină sau indometacin reduc net aceste fenomene prin scăderea PG intestinale.

La șobolani administrarea de substanțe de tip aspirinic care produc deficit de prostaglandine generează ulcere intestinale [84; 86]. De asemenea, la om, sînt citate, după tratament îndelungat cu indometacin, ulcerații și stricturi jejunale cu obstrucție consecutivă.

9.6.4.4. Miometru şi organele de reproducere

PG sînt implicate în controlul unor importante funcţii ale organelor de reproducere masculine şi feminine cum sînt: favorizarea transportului spermatozoizilor prin stimularea musculaturii netede uterine, controlul ovulaţiei, luteolizei şi menstruaţiei, declanşarea travaliului etc. Numeroase studii experimentale şi clinice au evidenţiat modificările motilităţii uterine la PG. La iepuri, cobai şi şobolan, PGE şi PGF contractă muşchiul uterin izolat. PGE_1 inhibă miometrul uman izolat şi îl stimulează *in vivo*. Sensibilitatea uterină la acţiunea PG este dependentă de momentul determinării în raport cu ovulaţia: în apropierea ovulaţiei, sensibilitatea creşte de 3—5 ori la acţiunea PGE_1 iar înainte de menstruaţie la acţiunea $PGF_{2\alpha}$.

În clinica umană PGE_2 şi PGF_2 au fost utilizate, pe cale i.v. sau orală, pentru declanşarea travaliului în sarcina la termen sau pentru efectuarea avortului terapeutic. Eficienţa în acest domeniu este datorată unui efect direct stimulant asupra musculaturii uterine.

9.6.5. *Efecte la nivelul miocardului şi musculaturii striate*

Sînt descrise de diverşi autori efecte inotrope şi cronotrope pozitive ale PG cu creşterea debitului cardiac. PGE_1 în concentraţii cuprinse între 10^{-7} şi 10^{-5} M produc creşterea amplitudinii şi duratei potenţialului de acţiune fără să modifice potenţialul de repaus la nivelul inimii de broască [94].

S-a demonstrat de asemenea pe fragmente de atriu izolat de la diferite specii [53] o acţiune bifazică, dependentă de doză, a PGE_1 asupra fazei de depolarizare a potenţialului de acţiune. În doză relativ mică, 5 ng/ml, PGE_1 creşte semnificativ viteza maximă de depolarizare, în timp ce concentraţia de 20 ng/ml scade viteza maximă de depolarizare. Tot pe preparate de inimă izolată s-a demonstrat antagonizarea prin PGA_2 şi $PGF_{2\alpha}$ a tahicardiei induse de aconitină.

Se sugerează că această acţiune antiaritmică a unor PG s-ar datora blocajului canalelor pentru sodiu ale membranei celulare [53; 98].

Experimente *in vitro*, pe frenic-diafragm, au evidențiat creșterea secusei musculare prin PGE_1 probabil prin facilitarea eliberării acetilcolinei din terminațiile nervoase [7].

Pe mușchi scheletic de broască PGE_1, în concentrații de 0,03—0,14 mM, se produce o potențare netă a contracției musculare care atinge un maximum în 5 — 20 minute, pentru ca ulterior răspunsul contractil să se diminueze pînă la valoarea de control sau sub această valoare, fiind asociat cu o prelungire a duratei contracției. Potențialul de membrană nu se modifică semnificativ. Se admite că PGE_1 acționează prin creșterea eficacității cuplajului depolarizare — contracție [64].

9.6.6. *Efecte asupra funcției renale*

PGE_1, PGE_2, PGA_1 și PGA_2 produc o redistribuție a fluxului sanguin de la nivelul medularei la nivelul corticalei renale cu creșterea volumului urinar, eliminarea sodiului, potasiului și a calciului și magneziului.

S-a demonstrat că cea mai mare concentrație de prostaglandine se găsește la nivelul medularei renale [33]. La acest nivel se găsesc prostaglandine din seria A, E și F.

PGE_2 este de cinci ori mai activă ca PGA_2 ca vasodilatator renal și diuretic. $PGF_{2\alpha}$ nu modifică fluxul renal și formarea urinii. Remarcabil faptul că, în timp ce PGE_2 și $PGF_{2\alpha}$ sînt inactivate de pulmon, PGA_2 nu este distrusă și ar putea avea funcții de hormon circulant.

Administrarea de PGA_2 duce la creșterea fluxului renal, excreției de sodiu, potasiu și apă urmate de scăderea rezistenței vasculare periferice prin vasodilatație arteriolară precum și creșterea frecvenței și a debitului cardiac [59]. Vascularizația renală este cel mai reactiv teritoriu vascular la PGA și se admite că efectul antihipertensiv al acestora este mediat în cea mai mare parte prin dilatație arteriolară intrarenală [32].

S-a sugerat de asemenea că angiotensina II mediază eliberarea prostaglandinelor din rinichiul contralateral și că geneza hipertensiunii reno-vasculare depinde în parte de interacția angiotensină-prostaglandine [68]. Eliberarea prostaglandinelor renale este uzual asociată cu antagonizarea acțiunilor vasoconstrictoare renale și antidiuretice ale angiotensinei II. Remarcabil că inhibitorii sintezei PG de tipul indometacinei cresc

net acţiunea vasoconstrictoare renală a angiotensinei II şi noradrenalinei, asociată cu incapacitatea hormonului presor de a produce eliberarea prostaglandinelor renale. Aceasta pledează suplimentar pentru funcţia modulatoare a prostaglandinelor asupra acţiunii hormonilor presori.

Se admite dealtfel existenţa unor antagonisme funcţionale între prostaglandine şi sistemul renină-angiotensină. Astfel angiotensina II, de exemplu, creşte rezistenţa vasculară periferică, scade ritmul cardiac şi debitul cardiac, creşte eliberarea de noradrenalină, creşte glicemia, scade eliminarea de sodiu şi apă, inhibă, prin mecanism *feed-back* negativ sinteza de renină şi stimulează sinteza prostaglandinelor. Efectele prostaglandinelor sînt practic opuse celor de mai sus: scad rezistenţa vasculară periferică, cresc ritmul şi debitul cardiac, scad eliberarea de noradrenalină, cresc eliminarea de sodiu şi apă, cresc cantitatea de renină circulantă şi glicogenogeneza. De remarcat că PGA_2 plasmatice scad net la pacienţii cu hipertensiune arterială esenţială. Este posibil ca în asemenea condiţii să se producă un fenomen invers faţă de condiţia normală, respectiv o redistribuţie a sîngelui în favoarea medularei renale şi în dauna corticalei cu elaborarea consecutivă de agenţi presori [59].

9.6.7. *Efecte asupra S.N.C.*

S-a demonstrat că ţesutul cerebral poate sintetiza prostaglandine de tipul E din precursorii corespunzători şi pot fi eliberate prin stimularea căilor aferente. Există o sensibilitate diferenţială a diferitelor regiuni ale S.N.C. la prostaglandine.

PG la nivelul S.N.C. sînt concepute în general ca modulatori, plasaţi între neurotransmiţătorul primar şi geneza AMP ciclic. La nivelul unor formaţiuni din S.N.C. s-a putut pune în evidenţă antagonizarea efectelor NA. de către PGE_1 şi PGE_2. Clorpromazina cunoscută şi ca blocant al eliberării de noradrenalină blochează eliberarea PG la nivelul cortexului cerebral de pisică, secundară stimulării formaţiei reticulate.

Administrarea de PGE_1 şi PGE_2 intraventricular, la diferite animale de laborator, [70; 71; 95] declanşează o creştere netă, rapidă şi tranzitorie a temperaturii corpului, efect dependent de doză. La animalele cu temperatură normală concentraţia

PG din lichidul cefalo-rahidian este redusă și crește considerabil în condiții de febră, scăzînd odată cu febra, după administrare de antipiretice de tip aspirinic [18, 19].

Administrarea de acid arahidonic intraventricular la șobolan produce de asemenea febră după o latență de peste 30 minute, efectul fiind de lungă durată, ceea ce sugerează că se realizează prin conversia acidului arahidonic în PGE [95].

Pe baza acestor date se poate admite că PGE sînt mediatori ai creșterii temperaturii corpului ca răspuns la diverși piretogeni.

9.6.8. *Efecte asupra agregării trombocitare*

Agregarea trombocitară produsă de ADP în prezența calciului este inhibată de o serie de compuși și substanțe medicamentoase (Fig. 9.4).

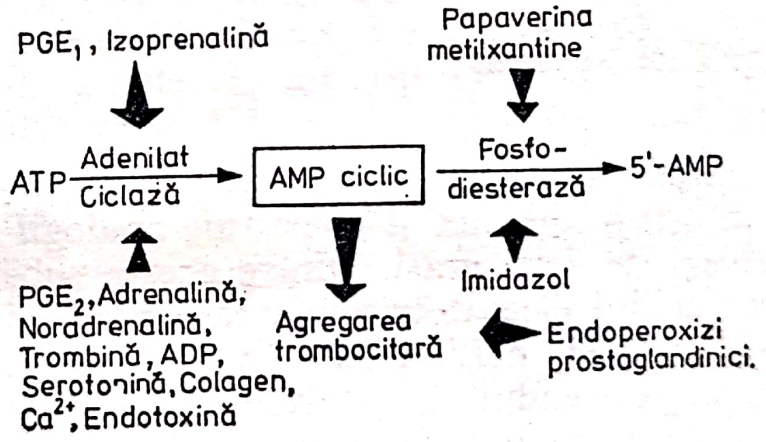


Fig. 9.4. Efectele prostaglandinelor asupra agregării trombocitare

PGE$_1$ inhibă agregarea indusă de trombină, colagen, complex antigen-anticorp, proces demonstrat atît *in vivo* cît și *in vitro*. Se pare că PGE$_1$ realizează acest efect prin inhibiția agregării trombocitare mediată de ADP și inhibiția eliberării constituenților plachetari în special a ADP care intensifică în continuare procesul de agregare. În stadiul acut al procesului trombotic, perfuzia i.v. lentă de PGE$_1$ are un efect favorabil. S-a arătat că în intimitatea sa acțiunea antiagregantă a PGE$_1$ s-ar realiza prin activarea adenilat-ciclazei și implicit prin creș-

terea AMP ciclic. Această acţiune este antagonizată de un activator de fosfo-diesterază-imidazolul şi de Ca^{2+} şi potenţată de teofilină şi alţi inhibitori de fosfo-diesterază.

Agenţii care scad concentraţia de AMP ciclic în trombocite intensifică agregarea aşa cum este cazul adrenalinei şi ADP [83]. Efectul adrenalinei de scădere a AMP ciclic este mediat prin stimularea α-adrenergică.

Spre deosebire de PGE_1, PGE_2 intensifică agregarea trombocitară indusă prin ADP. În acelaşi timp PGE_2 inhibă adenilat-ciclaza. Se pare însă că PGE_2 antagonizează competitiv PGE_1, la nivelul aceluiaşi receptor al membranei trombocitare, realizînd o aparentă scădere a activităţii enzimei, deoarece PGE_1 este un stimulator mai eficient al adenilat-ciclazei în raport cu PGE_.

9.7. Inhibitorii sintezei prostaglandinelor

9.7.1. *Analogii de substrat*

Dintre substanţele cunoscute ca inhibitori ai prostaglandin-sintetazei, un grup distinct îl constituie analogii substratului natural, derivaţi de acizi graşi. Dintre aceste substanţe foarte cunoscut este acidul eicosatetraenoic care produce o inhibiţie ireversibilă a enzimei, nefiind substrat enzimatic. S-a arătat de asemenea [58] că acidul eicosatetraenoic produce două tipuri distincte de efecte inhibitorii asupra prostaglandin-sintetazei: unul instantaneu, dependent de concentraţia inhibitorului şi un efect dependent de timp, caracterizat printr-o scădere progresivă şi ireversibilă a activităţii catalitice a enzimei. Au fost testaţi o serie de alţi derivaţi de acizi graşi, evidenţiindu-se efecte inhibitorii semnificative faţă de prostaglandin-sintetază.

O serie de derivaţi de tip prostaglandinic pot de asemenea bloca biosinteza prostaglandinelor. Astfel s-a demonstrat acţiunea unor derivaţi de tipul 5- sau 7-oxaprostaglandinei. Dintre cei mai eficienţi inhibitori face parte 5-oxaprost-13-*trans*-enoatul care produce o inhibiţie de 90% a PGE_2 şi $PGF_{2\alpha}$ în concentraţie de 150 μM.

9.7.2. *Inhibitorii de tip aspirinic*

Din această categorie fac parte în primul rînd substanțele antiinflamatorii nesteroidale care au ca prototip aspirina.

S-a arătat astfel că acest tip de substanțe inhibă eliberarea prostaglandinelor din diverse structuri ca o consecință a inhibiției sintezei acestora (tabelul IV).

Pe baza datelor existente [17] se poate estima următoarea ordine de potență, descrescătoare a inhibitorilor de prostaglandin-sintetază: acid meclofenamic > acid niflumic, indometacin > acid mefenamic > acid flufenamic > naproxen > fenilbutazona > aspirina, ibuprofen.

Datele experimentale sugerează că această proprietate inhibitorie a substanțelor de tip aspirinic este cvasispecifică, deoarece un număr important de alte substanțe active farmacodinamic sînt inactive ca inhibitori ai sintezei prostaglandinelor. Mai mult — izomeri ai acidului salicilic, fără efect terapeutic, sînt, în același timp, lipsiți de efecte inhibitorii la nivelul prostaglandin-sintetazei. De asemenea corticosteroizii puternic antiinflamatorii s-au dovedit inactivi ca inhibitori ai prostaglandin-sintetazei pînă la concentrații de 280 μ M. [17].

Dintre substanțele de alt tip care prezintă efecte inhibitorii ale sintetazei sînt de menționat Δ'-tetrahidro-canabinolul activ în concentrații de 10μ M, fenelzina, chinidina.

Potența inhibitorie a substanțelor de tip aspirinic față de prostaglandin-sintetază variază în funcție de preparatul enzimatic folosit. Astfel DI_{50} (concentrația inhibitorie 50%) a indometacinului față de enzime din veziculele seminale este de 10—100 ori mai mare decît față de cea provenită din splina de cîine sau plămînul de cobai [23].

Aceste diferențe explică și unele particularități farmacodinamice ca în cazul acetaminofenolului (paracetamol) care posedă proprietăți predominent antipiretice, este de 10 ori mai puțin eficient inhibitor al sintetazei din splină în raport cu aspirina dar are aproape aceeași eficiență față de enzima cerebrală. Astfel acțiunea sa aproape exclusiv antipiretică este în parte explicată de sensibilitatea diferită a prostaglandin-sintetazelor din diferite țesuturi. S-au putut pune în evidență variații de 1000 ori ale DI_{50} la indometacin față de prostaglandin-sintetază din diferite țesuturi. Pentru a interpreta efectele terapeutice ale substanțelor de tip aspirinic prin prisma meca-

nismului de inhibiţie a prostaglandin-sintetazei este necesar ca şi concentraţiile sanguine rezultate din administrarea dozelor terapeutice de substanţe să fie comparabile cu concentraţiile eficiente inhibitorii ale sintetazei. Datele obţinute de diverşi autori evidenţiază o bună corelaţie între concentraţiile inhibitorii ale sintetazei în vitro şi concentraţiile sanguine ale substanţelor antiinflamatorii utilizate la om sau animale.

Dozele terapeutice de indometacin (200 mg/zi), aspirină (3 g/zi) de exemplu realizează o scădere de 77—98% a eliminării urinare de cataboliţi ai prostaglandinelor.

9.7.2.1. Mecanismul inhibiţiei prin substanţe de tip aspirinic

În analiza mecanismului de acţiune a substanţelor de tip aspirinic se porneşte de la observaţia că majoritatea acestor compuşi sînt acizi organici, ceea ce sugerează o competiţie dintre aceste substanţe şi substrat pentru centrul catalitic al prostaglandin-sintetazei. Există date experimentale în favoarea acestei ipoteze evidenţiind [17] faptul că inhibiţia prin indometacin este dependentă de concentraţie de substrat.

Alte fapte experimentale susţin ipoteza unei inhibiţii competitiv — ireversibile care s-ar desfăşura în două metalităţi cinetice: o interacţie ireversibilă cu centrul catalitic al prostaglandin-sintetazei sau o interacţie cu un alt centru al enzimei suficient de apropiat de centrul catalitic şi căruia i s-ar reduce afinitatea pentru substrat printr-un mecanism allosteric. Cert este că majoritatea substanţelor de tip aspirinic inhibă prostaglandin-sintetaza într-o manieră ireversibilă. Degradarea metabolică a acestor substanţe precum şi neosinteza enzimei sînt factori importanţi ce determină durata lor de acţiune *in vivo*.

Diferiţi autori au pus în evidenţă efectul depresiv de durată al substanţelor de tip aspirinic asupra sintezei de prostaglandine la om. Această scădere a sintezei durează minimum 24 ore pînă la peste 2 zile de la întreruperea tratamentului cu aspirină, indometacin sau salicilat [10; 33; 42; 43].

În cazul aspirinei se admite un mecanism dual de acţiune iniţial datorat grupării acetil iar în etapa subsecventă datorită salicilatului rezultat din metabolism. Forma acetilată — respec-

TABELUL III

Inhibiția sintezei de prostaglandine (PG) prin substanțe de tip aspirinic în diferite preparate tisulare

Substanța	*Preparatul enzimatic folosit și tipul de PG implicat*	*(Concentrația M) inhibitorie 50% (I_{50})*
Ac. meclofenamic	Microzomi splenici de cîine (PGE_2)	0,1
	Microzomi renali de iepure (PGE_2)	1,4
	(PGF)	1,35
	Enzime din vezicule seminale de bovine (PGE_2)	13
	(PGF_2)	17
Indometacin	Omogenat de pulmon de cobai (PGF_2)	0,75
	Microzomi splenici de cîine (PGE_2)	0,17
	Omogenat de creier de iepure (PGE_2)	3,6
	Microzomi renali de iepure (PGE_2)	3,9
	(PGF_2)	3,7
	Enzime din vezicule seminale de bovine (PG Totale)	2
Fenilbutazona	Microzomi splenici de cîine (PGE_2)	7,25
	Microzomi renali de iepure (PGE_2)	19,5
	(PGF_2)	15
	Enzime din vezicule seminale de bovine (PG totale)	420
Aspirina	Omogenat de pulmon de cobai (PGF_2)	35
	Microzomi splenici de cîine (PGE_2)	37
	Omogenat de creier de iepure (PGE_2)	61
	Microzomi renali de iepure (PGE_2)	2500
	(PGF_2)	2800
	Enzime din vezicule seminale de bovine (PG totale)	820
Ibuprofen	Enzime din vezicule seminale de bovine (PG totale)	1200

tiv aspirina, acetilează proteinele, fapt ce explică durata lungă de acţiune a aspirinei deşi timpul de înjumătăţire plasmatic este de numai 20 minute. Pe de altă parte, acidul salicilic s-a dovedit slab activ *in vitro*, deşi *in vivo* activitatea sa este comparabilă cu a aspirinei. S-a sugerat însă că transpunerea acidului salicilic în acid gentizic în proporţie de aproximativ 10% este suficientă pentru explicarea acţiunii *in vivo*, ştiut fiind că acidul gentizic are o activitate antisintetazică de 30 ori mai mare decît acidul salicilic [17, 99].

9.7.2.2. Mecanismul unor efecte secundare ale substanţelor de tip aspirinic

Efectele secundare ale terapiei cu medicamente de tip aspirinic pot fi, în esenţă, considerate consecinţa modificării funcţiilor fiziologice ale prostaglandinelor în diferite ţesuturi. Astfel iritaţia gastro-intestinală care poate uneori genera ulcer poate fi consecinţa directă a inhibiţiei sintezei de prostaglandine în mucoasa gastrică fiind astfel îndepărtat un factor fiziologic de protecţie. Prostaglandinele pot proteja mucoasa gastrică în condiţii fiziologice, prin inhibiţia secreţiei acide şi creşterea fluxului sanguin la nivelul acesteia [45].

Aşa, de exemplu PGE_1 şi PGE_2 inhibă, la cîine, secreţia gastrică indusă de alimente, histamină, pentagastrină, 2-dezoxiglucoză, carbacol şi rezerpină [84]. Mai mult, analogii metilaţi ai PGE_2 (16-metil PGE_2 şi 16,16-dimetil PGE_2) sînt mult mai activi şi mai durabili inhibitori ai secreţiei gastrice în comparaţie cu produşii naturali, fiind eficienţi pe cale orală la animale şi om inhibînd atît secreţia bazală cît şi cea stimulată prin pentagastrină [85]. Inhibiţia sintezei de prostaglandine poate avea astfel drept consecinţă creşterea secreţiei acide, vasoconstricţie la nivelul mucoasei gastrice, precum şi creşterea concentraţiei locale a precursorului prostaglandinic — acidul arahidonic generator de iritaţie [20].

Alte efecte secundare generate însă la nivelul rinichiului sînt necroza papilară şi retenţia hidrosalină. Prostaglandinele cresc eliminarea de sodiu şi probabil retenţia hidrosalină produsă de derivaţii de tipul fenilbutazonă să fie consecinţa scăderii prostaglandinelor la nivel renal.

Scanned with OKEN Scanner

9.8. Inhibitorii degradării enzimatice a prostaglandinelor

În organism sau la nivelul țesuturilor izolate cea mai mare parte dintre prostaglandine sînt degradate pe cale enzimatică în cele patru modalități menționate anterior. Dintre aceste modalități de degradare cea mai eficientă este oxidarea catalizată de PGDH cu formarea de 15-ceto-derivați. PGDH are ca substrat PGE_1 și PGE_2 în timp ce PGF și PGA sînt slab oxidate iar PGB nu sînt deloc degradate pe această cale. O serie de analogi prostaglandinici sau acizi grași de tipul acidului arahidonic, linolenic și oleic, polifloretin fosfatul, agenți alchilanți ai grupărilor tiolice, metilxantinele și ionii de Ca^{2+} sînt inhibitori ai PGDH.

Interesant însă este că o serie de cercetători au pus în evidență faptul că substanțele de tip aspirinic cum sînt indometacinul, aspirina, acidul meclofenamic care inhibă prostaglandin-sintetaza, inhibă și degradarea enzimatică a prostaglandinelor [17].

Acest proces este evident *in vivo* sau *in vitro* și s-ar datora unei similitudini între receptorul prostaglandinic și PGDH, știut fiind că unii compuși de tip aspirinic, în special fenamații, antagonizează și efectul prostaglandinelor asupra mușchiului neted.

BIBLIOGRAFIE

1. Y. H. Abdulla, E. Mc. Farlane, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 2841 (1972).
2. G. Anderson, I. Hobbins, L. Cordero, L. Speroff, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **180**, 499 (1971).
3. N. Andersen, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **180**, 14 (1971).
4. Van C. G. Arman, R. P. Carlson, in „Future trends in inflamation" pg. 159, Piccin Med. Books, 1974.
5. H. Bekemeier, A. T. Giessler, R. Hirschelmann, *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, **26**, 5 (1974).
6. A. Bennett, C. A. Friedmann, J. R. Vane, *Nature*, **216**, 873 (197),6
7. V. Bettini, C. Cessi, M. Martechini, *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, **47**. 422 (1971).
8. P. B. Bradley, G. M. R. Samuels, J. E. Shaw, *Br. J. Pharmacol.*, **37**, 151 (1969).
9. J. J. Bruno, A. L. Taylor, M. T. Droller, *Nature*, **251**, 721 (1974).

Scanned with OKEN Scanner

Redactor: DELIA IACOB
Tehnoredactor: MIRCEA NASTA
Coli de tipar: 20
Tirajul: 2700 ex. Bun de tipar: 15 II 1977

Tiparul executat sub comanda
Nr. 643 la
Întreprinderea Poligrafică
„13 Decembrie 1918"
str. Grigore Alexandrescu nr. 89—97
București,
Republica Socialistă România

Scanned with OKEN Scanner